

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MARA CRISTINA SCHEFFER**

**GENOTIPAGEM E PESQUISA DE METALO-BETA-LACTAMASES EM  
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*  
RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS**

**CURITIBA**

**2008**

**MARA CRISTINA SCHEFFER**

**GENOTIPAGEM E PESQUISA DE METALO-BETA-LACTAMASES EM  
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*  
RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Libera Maria Dalla Costa

**CURITIBA**

**2008**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CENTRAL  
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS TÉCNICOS

Scheffer, Mara Cristina

Genotipagem e pesquisa de metalo-beta-lactamases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos / Mara Cristina Scheffer. – Curitiba, 2008.

115f. : il. algumas color., tabs.

Inclui bibliografia

Orientadora: Profª Drª Libera Maria Dalla Costa

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Infecções por Bactérias Gram-Negativas. I. Dalla Costa, Libera Maria. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. III. Título.

CDD 616.92

**GENOTIPAGEM E PESQUISA DE METALO-BETA-LACTAMASE EM ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*  
RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS**

Mara Cristina Scheffer

Dissertação submetida à comissão examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia dos Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Profa. \_\_\_\_\_ (UFPR)  
Libera Maria Dalla Costa

Prof. \_\_\_\_\_ (UFSC)  
Maria Luiza Bazzo

Prof. \_\_\_\_\_ (UNIFESP)  
Ana Cristina Gales

Curitiba  
2008

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Nazareno pelo apoio, carinho e cobrança.

Aos meus pais pelo incentivo.

Aos meus irmãos por sempre acreditarem.

Aos amigos e colegas de trabalho do Hospital Universitário/ UFSC, do Hospital de Clínicas/ UFPR e do Hospital Nossa Senhora das Graças pela compreensão.

A minha orientadora, Dra. Libera Maria Dalla Costa pela oportunidade e confiança.

A Professora Maria Luiza Bazzo pelo exemplo, incentivo e apoio.

Ao Professor Mário Stendel por abrir seu laboratório e pelo apoio técnico no início deste trabalho.

A colega de mestrado Mariana Fernandes Naime pelo companheirismo e pela amizade.

A todos aqueles que eu não citei e que deveria ter citado. Perdoem-me pela involuntária indelicadeza e aceitem meus sinceros agradecimentos. Tenho plena certeza de que nada se faz sem a ajuda de muitos.

A Deus por colocar as pessoas certas a cada passo da minha caminhada.

**A curiosidade sobre a vida em todos os  
aspectos é o segredo das pessoas  
muito criativas**

**Leo Burnett**

## RESUMO

O aumento das infecções nosocomiais por microrganismos resistentes representa um problema de saúde pública em razão da elevada mortalidade, principalmente pela limitada disponibilidade de agentes antimicrobianos efetivos. Neste contexto, *P. aeruginosa* destaca-se como um dos principais agentes responsáveis por este tipo de infecção. Os carbapenêmicos passaram a exercer importante papel no tratamento de infecções causadas por este microrganismo. No entanto, a resistência a eles foi aumentando entre bacilos gram-negativos paralelamente à sua utilização nos hospitais. Entre os principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos e o mais preocupante, pelo seu potencial de rápida disseminação, está a produção de metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS). Com base nestas circunstâncias, os principais objetivos deste trabalho foram genotipar isolados de *P. aeruginosa* para compreender seu mecanismo de disseminação e pesquisar M $\beta$ LS. Foram estudadas 78 amostras de *P. aeruginosa* isoladas no HU/UFSC, no período de junho de 2003 a junho de 2005. A variabilidade genética das amostras foi pesquisada utilizando as técnicas de RFLP, RAPD e PFGE. A sensibilidade aos antimicrobianos foi determinada por diluição em ágar. A pesquisa de M $\beta$ LS foi realizada por metodologias fenotípicas (dupla difusão em ágar, disco combinado e Etest®) e confirmada por PCR. Entre os isolados resistentes aos carbapenêmicos, 41,9% foi proveniente da UTI, a maior parte recuperada do trato urinário, seguido por infecções da corrente sanguínea. As opções terapêuticas para estes isolados se limitaram à polimixina B (100% Sensibilidade), à piperacilina/tazobactam (96,7% de Sensibilidade) e a ceftazidima (43% Sensibilidade). Das 40 amostras resistentes aos carbapenêmicos, 26 foram classificadas como pertencentes ao genótipo A, que é altamente relacionado ao descrito em *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 isoladas em distintas regiões do Brasil. A triagem para produção de M $\beta$ L foi realizada com 33 amostras, das quais seis amplificaram para PCR com os *primers* para o gene *bla*<sub>SPM-1</sub>, todas pertencentes ao genótipo A, e uma amplificou pela PCR utilizando *primers* para variantes IMP. Correlacionando as metodologias fenotípicas com a PCR, o teste de dupla difusão em ágar (CAZ/MPA) revelou as amostras SPM; e o disco combinado (IMP/EDTA) concordou com a PCR por detectar as sete amostras produtoras de M $\beta$ L. Estes foram os melhores testes para triagem de M $\beta$ L entre os pesquisados no presente trabalho, mas, em razão do pequeno número de amostras positivas, sugere-se a utilização de duas metodologias na rotina laboratorial, com a finalidade de melhorar a sensibilidade e especificidade da triagem, até a conclusão de novos estudos. A presença de um clone entre as amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, sugere transmissão cruzada como principal mecanismo de disseminação destes isolados, evidenciando a necessidade de melhorar as estratégias de controle de infecção no hospital.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Genotipagem. Resistência bacteriana. Metallo- $\beta$ -Lactamase

## ABSTRACT

The rise in the number of nosocomial infections caused by resistant microorganisms represents an important public health problem because of the increased mortality such infections lead to, particularly in light of the limited choice of effective antimicrobial agents. In this context, *P. aeruginosa* stands out as one of the main agents responsible for this type of infection. Carbapenems now play an important role in the treatment of infections caused by this microorganism; however, the resistance of gram-negative bacilli to carbapenems has grown with the increased use of these antibiotics in hospitals. One of the main and most worrying mechanisms of resistance to carbapenems, because of its potential for rapid dissemination, is the production of metallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS). In light of the above, the main objectives of this study were to genotype *P. aeruginosa* isolates in order to understand the dissemination mechanism and detect M $\beta$ LS. We studied 78 *P. aeruginosa* samples isolated from patients at the University Hospital, Federal University of Santa Catarina, between June 2003 and June 2005. The genetic variability of the samples was investigated using RFLP, RAPD and PFGE. Sensitivity to antimicrobial agents was determined by dilution in agar. The presence of M $\beta$ LS was investigated by phenotyping methods (double disk synergy test, combined disk and Etest®) and confirmed by PCR. Of the isolates that were resistant to carbapenems, 41.9% came from patients who were in the intensive care unit, and the majority of these isolates were from the urinary tract, followed by isolates from patients with bloodstream infections. The therapeutic options for these isolates were limited to polymyxin B (100% sensitivity), piperacilin/tazobactam (96.7% sensitivity) and ceftazidime (43% sensitivity). Of the 40 samples that were resistant to carbapenems, 26 were classified as belonging to genotype A, which is closely related to that described in SPM-1 producing *P. aeruginosa* isolates from various regions of Brazil. Thirty-three samples were screened for M $\beta$ L production; six of these were positive by PCR for the *bla*<sub>SPM-1</sub> gene and belonged to the A genotype, and one was positive by PCR when primers for IMP variants were used. The double-disk synergy test (CAZ/MPA) detected the SPM samples and the combined disk test found in the seven samples that were M $\beta$ L-positive by PCR, thus correlating with the results of phenotyping. These were the best tests for screening for the presence of M $\beta$ LS among those investigated in the present study, but because of the small number of positive samples it is suggested that two methods be used as part of normal laboratory procedures to improve screening sensitivity and specificity until further studies are completed. The presence of a clone among the carbapenem-resistant *P. aeruginosa* samples suggests that cross-transmission is the main dissemination mechanism of these isolates, thus highlighting the need to improve infection-control strategies in this hospital.



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Representação esquemática de integron de classe 1 de <i>P. aeruginosa</i> contendo gene cassete que codifica M $\beta$ L.....	27
<b>FIGURA 2</b>	Representação esquemática da estrutura tridimensional de M $\beta$ L.....	32
<b>FIGURA 3</b>	Multi-inoculador de Steer utilizado para dispensar o inóculo bacteriano em placa de ágar Muller-Hinton.....	44
<b>FIGURA 4</b>	Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR utilizando os <i>primers</i> 515F/1492R clivados com a enzima de restrição <i>Bam</i> HI dos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> .....	62
<b>FIGURA 5</b>	Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR utilizando os <i>primers</i> 515F/1492R clivados com a enzima de restrição <i>Hae</i> III dos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> .....	62
<b>FIGURA 6</b>	Polimorfismo nos fragmentos de restrição observados utilizando a enzima <i>Hae</i> III nos produtos da PCR ( <i>primers</i> 515F/1492R) em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> (HU/UFSC).....	63
<b>FIGURA 7</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida (4%) do produto da reação de RAPD utilizando o <i>primer</i> 208 em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> (HU/UFSC).....	64
<b>FIGURA 8</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida (4%) do produto da reação de RAPD utilizando o <i>primer</i> m13 em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> (HU/UFSC) .....	64
<b>FIGURA 9</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida (4%) do produto da reação de RAPD utilizando o <i>primer</i> 272 em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> (HU/UFSC).....	65
<b>FIGURA 10</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida (4%) do produto da reação de RAPD utilizando o <i>primer</i> 3303 em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> (HU/UFSC).....	65
<b>FIGURA 11</b>	Dendrograma de similaridade confeccionado com base nos resultados da reação de RAPD utilizando o <i>primer</i> 208 em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> (HU/UFSC).....	67
<b>FIGURA 12</b>	Dendrograma de similaridade confeccionado com base nos resultados da reação de RAPD utilizando o <i>primer</i> M13 em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> (HU/UFSC).....	68
<b>FIGURA 13</b>	Dendrograma de similaridade confeccionado com base nos resultados da reação de RAPD utilizando o <i>primer</i> 272 em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> (HU/UFSC).....	69
<b>FIGURA 14</b>	Dendrograma de similaridade confeccionado com base nos resultados da reação de RAPD utilizando o <i>primer</i> 3303 em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> (HU/UFSC).....	70
<b>FIGURA 15</b>	Gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) dos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos submetidos à restrição com a enzima <i>Spe</i> I.....	71

<b>FIGURA 16</b>	Dendrograma confeccionado com base no polimorfismo dos fragmentos de restrição em PFGE utilizando a enzima <i>SpeI</i> dos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> .....	72
<b>FIGURA 17</b>	Dendrograma e perfis eletroforéticos dos fragmentos de restrição em PFGE utilizando a enzima <i>SpeI</i> dos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos ..	73
<b>FIGURA 18</b>	Teste de dupla difusão em ágar entre o inibidor enzimático MPA e o substrato CAZ para detecção de MβL em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos...	75
<b>FIGURA 19</b>	Teste da dupla difusão em ágar entre o inibidor enzimático MPA e o substrato IMI para detecção de MβL em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos....	76
<b>FIGURA 20</b>	Teste da dupla difusão em ágar IMI/EDTA para detecção de MβL em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos.....	76
<b>FIGURA 21</b>	E-test® para detecção de MβL em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos.....	77
<b>FIGURA 22</b>	Eletroforese em gel de agarose (1%) dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> que apresentaram produtos de PCR utilizando <i>primers</i> para pesquisa do gene <i>bla<sub>SPM-1</sub></i> .....	77
<b>FIGURA 23</b>	Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando o isolado de <i>P. aeruginosa</i> que apresentou produto de PCR utilizando <i>primers</i> para pesquisa do gene <i>bla<sub>IMP-1</sub></i> .....	78
<b>FIGURA 24</b>	Eletroforese em gel de agarose (1%) de isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> e controles que apresentaram produtos de PCR com tamanhos compatíveis com o esperado para os genes <i>bla<sub>IMP-Like</sub></i> (590 pb) e <i>bla<sub>SPM-1</sub></i> (650 pb).....	78
<b>FIGURA 25</b>	Perfil de PFGE dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> pertencentes ao clone SP utilizando a endonuclease <i>SpeI</i> .....	92
<b>FIGURA 26</b>	Comparação entre o perfil de PFGE utilizando <i>SpeI</i> dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> (cluster PA) deste estudo (a, c) com o perfil representante de <i>P. aeruginosa</i> pertencente ao clone brasileiro (b).....	92

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1</b>	Distribuição dos 78 isolados de <i>P. aeruginosa</i> nas unidades de internação do hospital, segundo a sensibilidade aos carbapenêmicos.....	57
<b>GRÁFICO 2</b>	Faixa etária dos pacientes em anos segundo a sensibilidade das 78 amostras de <i>P. aeruginosa</i> aos carbapenêmicos.....	58
<b>GRÁFICO 3</b>	Correlação das amostras de <i>P. aeruginosa</i> classificadas como clonais pela técnica de PFGE versus RAPD com diferentes <i>primers</i> (208, M13, 272 e 3303).....	74
<b>GRÁFICO 4</b>	Aumento no halo de inibição pela adição de EDTA ao disco de Imipenem (disco combinado) em isolados de <i>P. aeruginosa</i> com PCR positivos ou negativos para MβL.....	79
<b>GRÁFICO 5</b>	Aumento no halo de inibição pela adição de EDTA ao disco de meropenem (disco combinado) em isolados de <i>P. aeruginosa</i> com pcr positiva ou negativa para MβL.....	80

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1</b>	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados na metodologia de RAPD em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> .....	48
<b>QUADRO 2</b>	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados na PCR para pesquisa de genes codificadores de MβL em isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> .....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Concentrações das soluções-estoque e concentrações testadas dos antimicrobianos para determinação da CIM em isolados de <i>P. aeruginosa</i> .....	43
<b>TABELA 2</b>	Distribuição dos 78 isolados de <i>P. aeruginosa</i> nas unidades de internação do hospital segundo o perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos.....	56
<b>TABELA 3</b>	Distribuição dos 78 isolados de <i>P. aeruginosa</i> por sítio anatômico segundo a sensibilidade aos carbapenêmicos.....	57
<b>TABELA 4</b>	Perfil de sensibilidade, CIM 50 e CIM 90 dos 29 isolados de <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos frente aos antibióticos anti-pseudomonas.....	59
<b>TABELA 5</b>	Perfis de sensibilidade observados entre os 29 isolados de <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos testados para determinação da CIM.....	60
<b>TABELA 6</b>	Perfil de sensibilidade, CIM 50 e CIM 90 dos 7 isolados de <i>P. aeruginosa</i> com resistência intermediária aos carbapenêmicos frente aos antibióticos anti-pseudomonas.....	60
<b>TABELA 7</b>	Perfil de sensibilidade, CIM 50 e CIM 90 dos 25 isolados de <i>P. aeruginosa</i> sensíveis aos carbapenêmicos frente aos antibióticos anti-pseudomonas.....	61
<b>TABELA 8</b>	Compilação do perfil eletroforético por PFGE com os resultados da pesquisa de M $\beta$ L nos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos.....	81

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

*A. baumannii* – *Acinetobacter baumannii*  
ASM – *American Society for Microbiology*  
ATCC – *American Type Culture Collection*  
BHI – *Brain Heart Infusion*  
CMI – Clínica Médica I  
CMII – Clínica Médica II  
CMI – Clínica Médica III  
CC – Clínica Cirúrgica  
CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*  
CIM – Concentração Inibitória Mínima  
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
DNA – Ácido Desoxirribonucléico  
dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfato  
DO – Densidade Óptica  
EDTA – Ácido etilenodiaminotereacético  
ELISA – Enzima Imuno Ensaio  
ESBL -  $\beta$ -lactamase de espectro estendido  
HMW – High Molecular Weight  
IMI - Imipenem  
Kb - kilobase  
LMW- Low Molecular Weight  
IMP – Imipenemase  
M $\beta$ L – Metallo- $\beta$ -lactamase  
MER – Meropenem  
MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio  
mg - miligrama  
ml - mililitro  
MPA - Ácido 2-mercaptopropionico  
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina  
MYSTIC – *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*

ng - nanograma

NNISS – *National Nosocomial Infection Surveillance System*

nm - nanômetro

*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PFGE – *Pulsed Field Gel Eletrophoresis*

pb – Pares de base

PBP<sub>s</sub> – Proteínas ligadoras de penicilina

pmol - picomol

RFLP -*Restriction Fragment Length Polymorphism*

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

RNA – Ácido Ribonucléico

rpm – rotações por minuto

SPM – São Paulo metalo-β-lactamase

SMA - ácido mercaptoacético

Taq polimerase – *Thermus aquaticus* polimerase

TBE - Tris-Borato-EDTA

TE – Tris EDTA

TSA – Ágar Trypticase-Soja

TSB – Caldo Trypticase-Soja

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UI – Unidade Internacional

UV – Ultra Violeta

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VIM – Verona imipenemase

VRE – Enterococo resistente a vancomicina

μ - micro

μg – micrograma

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 OBJETIVO GERAL .....	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>P. aeruginosa</i> .....	19
2.2 EPIDEMIOLOGIA .....	20
2.2.1 Metodologias Moleculares de Tipificação Epidemiológica .....	21
2.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS .....	23
2.3.1 Aspectos gerais .....	23
2.3.2 Metallo- $\beta$ -lactamases .....	26
2.3.2.1 Genes transferíveis.....	26
2.3.2.2 Classificação das M $\beta$ Ls.....	28
2.3.2.3 Inibidores de M $\beta$ Ls .....	32
2.3.2.4 Detecção de M $\beta$ Ls.....	33
2.4 DISSEMINAÇÃO DE <i>P. aeruginosa</i> PRODUTORA DE M $\beta$ L NO BRASIL .....	36
2.5 TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>P. aeruginosa</i> MULTI-RESISTENTES.....	38
<b>3 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>42</b>
3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS.....	42
3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA .....	42
3.2.1 Agentes Antimicrobianos Utilizados .....	43
3.2.2 Diluição do Antimicrobiano em placas de Ágar Müller-Hinton.....	44
3.2.3 Preparo do Inóculo Bacteriano .....	44
3.2.4 Inoculação Bacteriana em Ágar.....	45
3.2.5 Interpretação da Concentração Inibitória Mínima.....	45
3.3 MÉTODOS MOLECULARES .....	45
3.3.1 Extração do DNA para Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) e Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição (RFLP) .....	45
3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição (PCR-RFLP) .....	46
3.3.3 Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) .....	48
3.3.4 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) .....	49



3.3.4.1 Preparo dos blocos com DNA .....	49
3.3.4.2 Clivagem do DNA com Enzimas de Restrição .....	50
3.3.4.3 Eletroforese em Gel de Agarose em Campo Pulsado .....	50
3.3.5 Análise dos Padrões Moleculares .....	51
3.4 PESQUISA DE METALO- $\beta$ -LACTAMASE .....	51
3.4.1 Triagem Fenotípica Para Metallo- $\beta$ -Lactamase (M $\beta$ L) .....	51
3.4.1.1 Teste da Dupla Difusão em Ágar .....	52
3.4.1.2 Teste do Disco Combinado .....	53
3.4.1.3 Fita de E-test® .....	53
3.4.2 PCR para Detecção dos Genes de Metallo- $\beta$ -Lactamase .....	53
3.4.2.1 Extração do DNA .....	54
3.4.2.2 Amplificação .....	54
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> .....	56
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA .....	59
4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>P. aeruginosa</i> .....	61
4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição (PCR-RFLP) .....	61
4.3.2 Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) .....	63
4.3.3 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) .....	71
4.4 PESQUISA DE METALO- $\beta$ -LACTAMASES .....	74
4.4.1 Métodos Fenotípicos .....	74
4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	77
4.4.3 Comparação da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com as Metodologias Fenotípicas para Detecção de M $\beta$ L .....	79
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	82
5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>P. aeruginosa</i> .....	84
5.3 <i>P. aeruginosa</i> PRODUTORA DE M $\beta$ L .....	89
5.4 <i>P. aeruginosa</i> CLONE EPIDÊMICO BRASILEIRO .....	91
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A resistência a antimicrobianos emerge como um problema de saúde pública, uma vez que a velocidade de desenvolvimento e a introdução no mercado de novas drogas têm sido superadas pelo desenvolvimento de mecanismos de resistência bacterianos (MURTHY, 2001). No ambiente hospitalar inúmeros fatores contribuem para o aumento das infecções por microrganismos resistentes, entre eles a pressão seletiva dos antimicrobianos pelo uso excessivo e/ou inadequado, fatores relativos ao hospedeiro (como doenças de base tais como diabetes, falência renal ou neoplasias), longos períodos de hospitalização, procedimentos cirúrgicos, utilização de cateteres, terapia prévia com antimicrobianos, além de falhas relativas ao controle de infecção hospitalar (SING *et al.*, 2006).

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo gram-negativo oportunista, sempre presente entre os primeiros do *ranking* na epidemiologia das infecções nosocomiais (NNISS, 1996; RICHARDS *et al.*, 1999; SADER *et al.*, 2001; SANTUCCI *et al.*, 2003; PIER *et al.*, 2005). Seu sucesso no ambiente hospitalar é proveniente da sua capacidade de adaptação às condições ambientais de nutrição, temperatura e umidade e a sua resistência intrínseca ou adquirida a diversos antimicrobianos e desinfetantes (FAVERO *et al.*, 1971 TAVARES, 2002).

As infecções por *P. aeruginosa* são geralmente de tratamento difícil em razão da limitada oferta de agentes antimicrobianos efetivos. Diante deste quadro, os carbapenêmicos,  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, estáveis à maioria das  $\beta$ -lactamases secretadas por esse microrganismo, tornaram-se uma classe de drogas importante para o tratamento dessas infecções (TROILET, 1997). Infelizmente, paralelamente à sua utilização nos hospitais, a resistência aos carbapenêmicos foi aumentando entre bacilos gram-negativos, principalmente *P. aeruginosa*.

Entre os principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos o mais preocupante, devido ao seu potencial de rápida disseminação, é a produção de metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls). *P. aeruginosa* produtoras de M $\beta$ Ls estão sendo associadas ao aumento da mortalidade, principalmente pela falta de opções terapêuticas (LAUPLAND *et al.*, 2005; ZAVASCKI *et al.*, 2006).

A mobilidade dos genes que codificam as M $\beta$ L, tanto genética como geograficamente, aliada à dificuldade de erradicação dos microrganismos produtores desta enzima, são responsáveis pelo aumento no seu isolamento, representando uma clara ameaça à terapia antimicrobiana atual (TOLEMAN *et al.*, 2005). As M $\beta$ L têm se disseminado rapidamente através de muitos países, particularmente do sudeste da Ásia, da Europa e da América Latina (WALSH *et al.*, 2005). No Brasil, a emergência e disseminação de um clone epidêmico produtor de M $\beta$ L têm contribuído para as altas taxas de resistência aos carbapenêmicos observadas entre isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* (GALES *et al.*, 2003).

A emergência de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), desde o primeiro isolamento em julho de 2003, motivou o presente estudo. Compreender o mecanismo de tal resistência, bem como entender o modo de disseminação deste patógeno, foi considerado fundamental para analisar a epidemiologia da infecção nosocomial e auxiliar no desenvolvimento de medidas racionais para controlar a disseminação deste microrganismo. Para tal finalidade, a utilização de ferramentas moleculares é essencial. O custo da utilização destas técnicas torna-se irrelevante quando comparado aos valores associados à emergência de infecções nosocomiais, ao aumento da resistência a antimicrobianos e ao aumento na morbidade e mortalidade.

O entendimento do mecanismo de disseminação dos patógenos multirresistentes no ambiente hospitalar é essencial para o planejamento de medidas efetivas de controle de infecção. Uma política de prevenção destas infecções acarretaria em diminuição direta dos custos do tratamento em razão da redução no tempo de hospitalização e da utilização de antimicrobianos de amplo espectro, proporcionando melhor prognóstico aos pacientes, uma vez que as infecções causadas por *P. aeruginosa* apresentam elevadas taxas de mortalidade.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral genotipar as amostras de *P. aeruginosa* e pesquisar M $\beta$ L como mecanismo de resistência bacteriana aos carbapenêmicos no HU/UFSC.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a variabilidade genética de *P. aeruginosa* isoladas no HU/UFSC no período de 06/2003 a 06/2005, pelas técnicas de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*), Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*) e Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e determinar sua relação com o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos;
2. Entender a disseminação do patógeno em função da análise da variabilidade genética observada;
3. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados frente às principais drogas anti-pseudomonas;
4. Avaliar métodos fenotípicos para pesquisa de MβLs passíveis de utilização na rotina laboratorial;
5. Pesquisar os principais genes que codificam as MβLs pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *P. aeruginosa*

Pertencente à família *Pseudomonadaceae*, *P. aeruginosa* é um bacilo gram-negativo não fermentador de glicose, estritamente aeróbio, que não forma esporos e é móvel devido à presença de um único flagelo (WIN, Jr. *et al.*, 2006). Distingue-se do resto das espécies do grupo das pseudomonas fluorescentes de importância clínica por sua habilidade de crescer a 42°C (FORBES *et al.*, 1998). Outros testes que confirmam sua identificação são as provas para a enzima citocromo oxidase (catalisa o último passo da cadeia respiratória e está presente em bactérias aeróbias estritas) e para a enzima arginina dehidrolase (transforma a arginina em ornitina, amônia e dióxido de carbono), ambas positivas (BLONDEL-HILL *et al.*, 2007).

*P. aeruginosa* é facilmente reconhecida nos meios de isolamento primário com base na sua morfologia colonial característica, produção de pigmento e odor semelhante ao de uvas. As colônias são geralmente planas e espalhadas com bordas irregulares e brilho metálico (associado com autólise da colônia). Podem apresentar-se com outras morfologias, incluindo lisas, mucóides e anãs (pequenas colônias variantes). Os microbiologistas devem ficar atentos a certas variações no fenótipo deste microrganismo, uma vez que isolados sem atividade oxidativa têm sido reportados ocasionalmente, mas eles exibem outras características típicas. Terapias com agentes antimicrobianos que afetam a síntese protéica podem causar o aparecimento de fenótipos aberrantes. Isolados mucóides como os frequentemente encontrados em pacientes com fibrose cística, podem sofrer várias mudanças fenotípicas incluindo crescimento lento, perda de mobilidade e perda da produção de pigmento (BLONDEL-HILL *et al.*, 2007).

Esse microrganismo produz várias substâncias que podem contribuir para aumentar a colonização e infecção do tecido hospedeiro. Uma variedade de fatores de virulência incluindo lipopolissacarídeos (LPS), exotoxina A, leucocidina, alginato, proteases, fosfolipases e várias outras enzimas, fazem de *P. aeruginosa* a bactéria de maior significância clínica entre os bacilos gram-negativos não fermentadores de glicose (WIN, Jr. *et al.*, 2006).

Stover e colaboradores (2000) seqüenciaram o genoma completo da linhagem da *P. aeruginosa* PAO1; com 6,3 milhões de pares de base, é o maior genoma bacteriano já seqüenciado. *P. aeruginosa* contém a maior proporção de genes regulatórios observados em um genoma bacteriano e um grande número de genes envolvidos no catabolismo, transporte e efluxo de compostos orgânicos, bem como quatro sistemas potencialmente quimiotáticos. Os autores propõem que o tamanho e a complexidade do genoma de *P.aeruginosa* reflitam uma adaptação evolucionária permitindo-lhe crescer em diversos ambientes e resistir ao efeito de uma variedade de substâncias antimicrobianas (STOVER *et al.*, 2000).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

Habitante natural do meio ambiente é encontrada no solo, na água, na superfície de objetos, e sobre a pele e vestimenta de seres humanos (TAVARES, 2002). No ambiente hospitalar colonizam pias, torneiras, soluções anti-sépticas (desinfetantes e de uso terapêutico) e equipamentos respiratórios que lhe servem de reservatório devido à sua habilidade de sobreviver por períodos prolongados em ambientes úmidos (IGLEWSKI, 1996; MOOLENAR *et al.*, 2000). Sua disseminação pode ocorrer de paciente a paciente, por contato com fômites ou pela ingestão de alimentos ou água contaminada (IGLEWSKI, 1996). Infecções normalmente acontecem em sítios úmidos como orifício de traqueostomia, inserção de cateter, queimaduras, ouvido externo (otite de nadador) e feridas cutâneas úmidas. Também está associada a infecções do trato urinário e do trato respiratório inferior (WIN, Jr. *et al.*, 2006).

Conhecida há muitos anos por ser causadora de infecções cirúrgicas e de ferimentos graves, geralmente considerada um invasor secundário ou oportunista e não causa de infecções primárias em tecidos saudáveis, *P. aeruginosa* tem emergido como um dos principais patógenos nosocomiais em imunocomprometidos e pacientes debilitados, bem como em pacientes com fibrose cística (PIER, RAMPHAL, 2005). *P. aeruginosa* foi a principal causa de infecção hospitalar dentre todos os patógenos relacionados com pneumonia em Unidades de Terapia Intensiva nos Estados Unidos (RICHARDS *et al.*, 1999). Aparece, ainda, como o 4º agente

mais freqüente de infecção de sítio cirúrgico, o 5º de infecções hospitalares em geral e o 6º de infecções da corrente sanguínea (NNISS, 1996). Os dados do programa SENTRY mostraram que, no Brasil, *P. aeruginosa* foi o patógeno mais freqüente em isolados de pneumonia hospitalar, o segundo em infecções do trato urinário e infecções de ferida cirúrgica e o sétimo patógeno mais freqüente em infecções da corrente sanguínea, nos hospitais avaliados pelo programa (SADER *et al.*, 2001). Foi considerado também o segundo patógeno mais freqüente em infecções de pacientes queimados (SANTUCCI *et al.*, 2003). A alta incidência de *P. aeruginosa* pode ser atribuída a diversas propriedades como a fácil adaptação às condições ambientais de nutrição, temperatura e umidade, e a sua capacidade de receber e transmitir fatores de resistência a antimicrobianos (FAVERO *et al.*, 1971).

Desde que Koch descobriu como fazer crescer bactérias em cultura pura, o laboratório tem sido um componente integral dos estudos epidemiológicos de doenças bacterianas. A habilidade em diferenciar isolados bacterianos da mesma espécie tem aumentado, melhorando a investigação e vigilância de surtos, estudos da história natural da infecção, e entendimento da transmissão, patogênese e filogenia da bactéria (FOXMAN *et al.*, 2005). Métodos moleculares são atualmente considerados os de maior acurácia para tipificar microrganismos com finalidade epidemiológica, e *P. aeruginosa*, um dos patógenos nosocomiais mais comuns, tem sido alvo freqüente em estudos que utilizam estas metodologias.

### 2.2.1 Metodologias Moleculares de Tipificação Epidemiológica

O poder de resolução da tipificação de microrganismos tem sido expandido por análise molecular do DNA. A reprodução clonal dentro de linhagens microbianas faz da estrutura do DNA, um potencial marcador estável e específico da transmissão microbiana (STRUELENS *et al.*, 1996).

Os genes 16S RNAr encontrados em todas as bactérias acumulam poucas mutações, sendo utilizados em estudos filogenéticos (RELMAN, 1993). Porções altamente variáveis dessa seqüência são características únicas de uma bactéria e fornecem informações úteis a respeito da relação entre elas. O seqüenciamento das regiões variáveis é muito utilizado para caracterizar espécies bacterianas (RELMAN, 1993).

Entre as metodologias de tipificação molecular freqüentemente utilizadas para estudo de *P. aeruginosa* está o Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD). Esta técnica é uma variação da PCR, baseada no uso de um único *primer*, geralmente com 10 nucleotídeos, cuja seqüência não é direcionada para nenhum *locus* gênico conhecido, ou seja, não têm um alvo específico no DNA bacteriano. Este iniciador hibridiza ao acaso em sítios cromossômicos iniciando a polimerização, o que resulta na amplificação de um ou mais *locus* ao acaso no DNA cromossômico. A metodologia utiliza baixas temperaturas de pareamento, possibilitando a hibridização imperfeita em múltiplos locais no cromossomo, levando à amplificação quando dois dos *primers* se pareiam em regiões próximas e complementares (SINGH, 2006). Estes autores relataram que o método é muito suscetível a variações técnicas, e pequenas variações nas condições de reação ou nos reagentes podem acarretar dificuldades na reprodutibilidade dos resultados. Nesta mesma revisão os autores afirmaram que, em condições altamente controladas, o RAPD pode apresentar alto nível de discriminação, especialmente quando múltiplos *primers* são utilizados (SINGH *et al.*, 2006).

A reprodutibilidade e o poder discriminatório da tipificação genética por técnica de RAPD para análise de *P. aeruginosa* foi avaliada em diversos estudos, principalmente em isolados de pacientes com fibrose cística (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 1996; RENDERS *et al.*, 1996; CAMPBELL *et al.*, 2000; SILVA FILHO *et al.*, 2001). Segundo Renders e colaboradores (1996), RAPD pode ser utilizado com confiança como triagem primária na caracterização epidemiológica de *P. aeruginosa*. Campbell e colaboradores (2000) relataram que a metodologia foi altamente reprodutível e capaz de diferenciar isolados não relacionados, sendo indicada para análise de um grande número de amostras. Em estudos com isolados de fibrose cística, Maehenthiralingam e colaboradores (1996) sugerem que os *primers* 208 e 272 (10pb) podem ser utilizados com sucesso para tipificação de *P. aeruginosa*. No Brasil, Silva Filho e colaboradores (2001) utilizaram RAPD para estudo da epidemiologia molecular de infecções em fibrose cística. A utilização dessa metodologia demonstrou a persistência de um genótipo único de *P. aeruginosa* em cada paciente durante o período do estudo (SILVA FILHO *et al.*, 2001).

A Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) é uma metodologia baseada na medida indireta da seqüência genética (FOXMAN *et al.*, 2005). A técnica utiliza endonucleases, que reconhecem sítios infreqüentes no genoma, para digestão do



cromossomo bacteriano. Isto gera um pequeno número de fragmentos de tamanhos diferentes, que formam padrões distintos quando são separados por uma eletroforese especial utilizando campo elétrico de polaridade variável (MASLOW *et al.*, 1993). Enquanto que na eletroforese convencional fragmentos de DNA maiores do que 40 a 50 kb (kilobases) não migram eficientemente, a mudança periódica na direção do campo elétrico utilizada no PFGE permite separar moléculas de DNA maiores que 1.000 kb (SINGH *et al.*, 2006).

Para interpretar os padrões de fragmentos de DNA gerados por PFGE e transformar esta informação em uma ferramenta epidemiologicamente útil para tipificação de patógenos nosocomiais, o microbiologista deve saber como comparar os padrões de PFGE e entender como eventos genéticos podem alterar estes padrões (SINGH *et al.*, 2006). Tenover e colaboradores (1995) propuseram critérios para interpretação de PFGE. Segundo estes critérios, isolados são considerados geneticamente indistinguíveis se os padrões de restrição apresentam fragmentos do mesmo número e tamanho, e epidemiologicamente estes isolados são considerados representantes da mesma cepa. Padrões que apresentam diferenças de até 3 fragmentos devem ser considerados altamente relacionados, estas variações podem ser consistentes com um único evento genético (mutação pontual, inserção ou deleção), e estes isolados representam subtipos epidemiologicamente relacionados da mesma cepa. Diferença de quatro a seis fragmentos de restrição pode corresponder a dois eventos genéticos independentes (inserção, deleção, ganho ou perda de sítio de restrição), e estes isolados podem ser considerados possivelmente relacionados. Um isolado é considerado não relacionado a outro se os padrões de PFGE diferirem em sete ou mais fragmentos de restrição (TENOVER *et al.*, 1995).

## 2.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

### 2.3.1 Aspectos gerais

O aumento da resistência aos antimicrobianos entre as bactérias gram-negativas é um exemplo notável de como as bactérias podem procurar, manter e expressar novas informações genéticas que conferem resistência a uma ou a várias drogas (WALSH *et al.*, 2005). A alta resistência de *P. aeruginosa* aos

antimicrobianos e desinfetantes, resultante de mecanismos intrínsecos e adquiridos, tornou bastante limitada a possibilidade de escolha de agentes efetivos para tratar estas infecções (HANCOCK, 1998).

Um grupo importante de antimicrobianos que atua na síntese da parede celular é o grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, que constituem uma família de substâncias caracterizadas pela presença de um grupamento químico heterocíclico azetidiona denominado anel  $\beta$ -lactâmico, responsável pela atividade antimicrobiana desses compostos (LIVERMORE, 1995). Ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos pertencem duas das mais importantes classes de antibióticos: as penicilinas e as cefalosporinas. Entre os últimos  $\beta$ -lactâmicos descritos destacam-se as cefamicinas e os carbapenêmicos (HANCOCK, 1998).

Carbapenêmicos, principalmente imipenem e meropenem, são importantes opções terapêuticas utilizadas em infecções nosocomiais causadas por patógenos gram-negativos multirresistentes. Estes antimicrobianos apresentam amplo espectro de atividade e são estáveis à hidrólise pela ação da maioria das  $\beta$ -lactamases, incluindo as de amplo espectro (ESBL) e as  $\beta$ -lactamases cromossomais (AmpC) (LIVERMORE *et al.*, 1992; WOODFORD *et al.*, 2000). Apresentam ainda, excelente permeabilidade através da membrana externa bacteriana e elevada afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilinas do tipo 2 (PBP 2) (CORNAGLIA *et al.*, 1995). Entretanto, isolados nosocomiais podem facilmente desenvolver resistência (LAGATOLLA, 2006). Vários mecanismos podem contribuir para a aquisição de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos em *P. aeruginosa*. Entre os mecanismos mais comuns estão a diminuição da penetração da droga (mutações em proteínas de membrana externa e bombas de efluxo), a hiperprodução de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC, e ou a produção de  $\beta$ -lactamases que hidrolisam carbapenêmicos (WALSH *et al.*, 2005).

Na ausência de enzimas que hidrolisem de forma eficiente os carbapenêmicos, o mecanismo que leva à resistência a essas drogas é normalmente multifatorial (QUALE *et al.*, 2006). O mecanismo mais comum em isolados resistentes aos carbapenêmicos é a diminuição de porinas, principalmente a porina OprD (LIVERMORE, 1992; PAI *et al.*, 2001). Quale e colaboradores (2006) encontraram diminuição da expressão de OprD em todos os isolados resistentes a esta classe de antimicrobianos. A maioria dos isolados também apresentou aumento de AmpC e de expressão de bomba de efluxo (QUALE *et al.*, 2006).

Beta-lactamases do tipo AmpC codificadas no cromossomo de *P. aeruginosa* podem contribuir para a resistência intrínseca desta bactéria aos  $\beta$ -lactâmicos. Entretanto, a contribuição desta enzima para a resistência aos carbapenêmicos parece ser mínima, visto que apenas um pequeno efeito foi observado pela diminuição de AmpC na cepa PA01, provavelmente em decorrência da estabilidade dos carbapenêmicos à maioria das  $\beta$ -lactamases (OKAMOTO, 2001). Em 1992 Livermore relatou que o aumento na atividade de AmpC e a diminuição da porina OprD afetam principalmente o imipenem, podendo elevar a CIM a 16  $\mu\text{g/ml}$ , tendo pouco efeito sobre o meropenem, com CIMs variando entre 2 e 4  $\mu\text{g/ml}$ . A molécula de imipenem (peso molecular 299) difunde através do canal OprD dez vezes mais rápido que a de meropenem (peso molecular 383.5), enquanto que o coeficiente de penetração dos dois carbapenêmicos é bem semelhante em cepas com deficiência de OprD (TRIAS and KIKAIIDO, 1990). Em outro estudo, Epp e colaboradores (2001) sugeriram que alterações na estrutura da OprD (alça L7) seriam responsáveis pela dissociação entre a atividade do imipenem e do meropenem. Um encurtamento da suposta alça L7 da porina OprD por dois resíduos de aminoácidos, abriria suficientemente o canal da porina para permitir a penetração ótima do meropenem e aumentaria a sua atividade. Em contraste, esta alteração não afetaria a suscetibilidade de uma molécula menor de carbapenêmico, como o imipenem (EPP *et al*, 2001). Em estudo com amostras que apresentavam diferentes níveis de resistência aos diferentes carbapenêmicos, Quale e colaboradores (2006) relataram a diminuição na expressão de OprD em todos os isolados resistentes a meropenem e imipenem. Nesse mesmo estudo a maioria dos isolados resistentes a meropenem e imipenem também apresentou aumento na expressão de AmpC (QUALE *et al*, 2006).

Outros mecanismos de multirresistência em *P. aeruginosa* são os sistemas de efluxo. O sistema MexAB-OprM é expresso constitutivamente nos isolados selvagens de *P. aeruginosa*, e os substratos para estas bombas incluem fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol e  $\beta$ -lactâmicos (incluindo carbenicilina, piperacilina, ceftazidima, cefepime, e aztreonam). O imipenem parece não ser um substrato para MexAB-OprM, mas devido à sua cadeia hidrofóbica, o meropenem pode ser afetado por este sistema (QUALE *et al*, 2006). O sistema MexCD-OprJ não é expresso em condições normais de crescimento, seus substratos incluem fluoroquinolonas e  $\beta$ -lactâmicos anti-pseudomonas como

cefepime, piperacilina e meropenem, mas não incluem carbenicilina, aztreonam, ceftazidima e imipenem (MASUDA *et al.*, 2000). Outro sistema de efluxo, o MexEF-OprN, pode exportar fluoroquinolonas, trimetoprim e cloranfenicol (QUALE *et al.*, 2006). MexXY-OprM pode contribuir para a resistência a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e alguns  $\beta$ -lactâmicos como piperacilina, cefepime e meropenem, mas não carbenicilina, ceftazidima e imipenem (MASUDA *et al.*, 2000).

### 2.3.2 Metallo- $\beta$ -lactamases

Altos níveis de resistência aos carbapenêmicos (CIM >32  $\mu\text{g/ml}$ ) estão geralmente relacionados à produção de carbapenemases do tipo metallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS). Estas carbapenemases representam a família com maior versatilidade entre as  $\beta$ -lactamases, com um espectro de ação incomparável às outras enzimas que hidrolisam  $\beta$ -lactâmicos e resistência à inibição por todos os inibidores de  $\beta$ -lactamases disponíveis comercialmente. Dentro do grupo das carbapenemases, as M $\beta$ LS são enzimas que contêm pelo menos um átomo de zinco como co-fator no sítio ativo, que facilita a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico bicíclico (QUEENAN, BUSH, 2007). A primeira  $\beta$ -lactamase zinco-dependente foi descrita em meados de 1960 em *Bacillus cereus* (BCII); no início dos anos 80 uma segunda penicilinase zinco-dependente foi descrita em *Stenotrophomonas maltophilia* (L1). Posteriormente foram descritas metallo- $\beta$ -lactamases capazes de hidrolisar o imipenem em *Aeromonas hydrophila* e *Bacteroides fragilis* (apud BUSH, 1998). Até o início de 1990 todas as carbapenemases eram descritas como  $\beta$ -lactamases espécie-específicas, produzidas intrinsecamente e codificadas cromossomicamente. A caracterização de IMP-1 em *P. aeruginosa*, uma metallo- $\beta$ -lactamase codificada por plasmídeo, estrutura que confere mobilidade ao gene, apresentou M $\beta$ LS móveis, ou M $\beta$ LS adquiridas, mudando o padrão de disseminação desta classe de enzimas (WATANABE *et al.*, 1991, QUEENAN, BUSH, 2007).

#### 2.3.2.1 Genes transferíveis

Genes transferíveis que codificam M $\beta$ L são encontrados como genes cassetes em *integrans* de classe 1 e *integrans* de classe 3. Genes cassetes são

pequenos pedaços de DNA circular, de aproximadamente 1kb, compreendendo um único gene junto com um sítio de recombinação, o elemento 59-base (WALSH *et al.*, 2003). *Integrans* são capazes de procurar genes cassetes através de eventos de recombinação sítio-específicos entre dois sítios de DNA, um no *integron* e um no gene cassette. Os *integrans* consistem de 3 regiões: região conservada 5', região conservada 3' e região variável. A região 5' é constituída pelo gene integrase (*intI*), adjacente ao sítio de recombinação (*attI*), e um gene promotor, que facilita a expressão do gene cassette na região variável. A região conservada 3' geralmente consiste de um gene *qac* parcialmente deletado (*qacEΔ1*), fundido com um gene *sul*, e confere resistência a anti-sépticos e sulfonamidas (TOLEMAN *et al.*, 2003) (Figura 1).

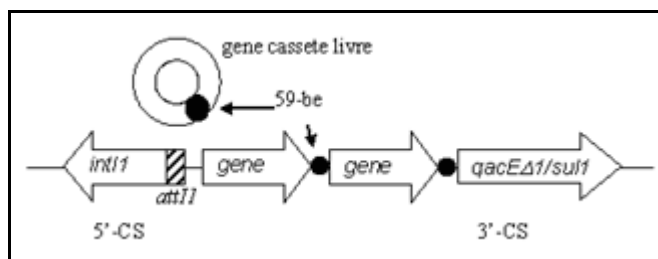


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE INTEGRON DE CLASSE 1 DE *P. aeruginosa* CONTENDO GENE CASSETE QUE CODIFICA M<sup>BL</sup>. AS SETAS INDICAM A ORIENTAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO. *INTI1* REPRESENTA O GENE DA INTEGRASE. *ATTI1* REPRESENTA O SÍTIO DE RECOMBINAÇÃO.

FONTE: Castanheira (2005)

Enquanto genes que carregam resistência a aminoglicosídeos e β-lactâmicos podem mover-se livremente de um integron a outro, eles não podem mover-se sozinhos de um microrganismo a outro e requerem a assistência de outros elementos genéticos como os plasmídeos e os transposons (BENNET, 1999). A mobilidade destes elementos combinados pode conferir um enorme potencial para disseminação desses genes entre patógenos nosocomiais via transposição em plasmídeos conjugativos (TOLEMAN *et al.*, 2003).

### 2.3.2.2 Classificação das MβLs

Baseada nas propriedades funcionais, em 1989 Bush classificou as MβLs como pertencentes ao grupo 3. As β-lactamases deste grupo hidrolisam o imipenem, são inibidas por quelantes de íons metálicos (zinco) e não sofrem ação dos inibidores das serina β-lactamases disponíveis comercialmente, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BUSH, 1998). Esta classificação foi atualizada em 1995 e modificado em 1997 para acomodar o crescente número de enzimas que vêm sendo continuamente classificadas como pertencentes ao grupo 3 (RASMUSSEN and BUSH, 1997). Esta última classificação separa as enzimas em subgrupos com base na hidrólise do imipenem e de outros β-lactâmicos: 3a – possuem amplo espectro de atividade; 3b – apresentam atividade preferencial por carbapenêmicos e não são detectadas com nitrocefina, 3c – hidrolisam fracamente os carbapenêmicos em comparação a outros substratos β-lactâmicos (RASMUSSEN and BUSH, 1997). Todas as enzimas do grupo 3 são universalmente inibidas pelo EDTA e outros agentes quelantes de cátions divalentes (BUSH, 1998).

Na classificação molecular das β-lactamases feita por Ambler em 1980, a classe A representava um grupo de enzimas que apresentava o aminoácido serina no sítio ativo, uma única MβL havia sido identificada (BCII) e foi categorizada como pertencente à classe B, pois apresentava íons divalentes (zinco) como co-fator (apud RASMUSSEN and BUSH, 1997). Atualmente, a caracterização de várias metalo-enzimas, agrupadas na classe B de Ambler, proporcionou uma subdivisão desta classe baseada na seqüência de aminoácidos e em outros fatores estruturais (WALSH *et al.*, 2005). Foram enquadradas na classe B1, enzimas que apresentam o co-fator zinco coordenando resíduos de três histidinas e uma cisteína (IMP, VIM, GIM, SIM e SPM-1); as da classe B2 apresentam uma asparaginina antes da histidina na primeira posição (NXHxD de *Aeromonas* spp e SFH-1 de *Serratia fonticola*); a única representante da classe B3 (L1 de *Stenotrophomonas maltophilia*) é representada funcionalmente como um tetrâmero (apud WALSH *et al.*, 2005).

Atualmente são conhecidas cinco subclasses de MβL B1 adquiridas:

#### **IMP - Imipenemase**

A primeira indicação de MβL móvel ocorreu no Japão em 1988 em *P. aeruginosa* GN17203. Este isolado apresentou uma CIM para imipenem de 50 µg/ml e resistência à ceftazidima com uma CIM > 400 µg/ml. O alelo de resistência foi

encontrado em um plasmídeo conjugativo (transferível) que poderia ser prontamente mobilizado para outras *Pseudomonas* (WATANABE *et al.*, 1991). Anos mais tarde, um gene idêntico foi caracterizado em amostras de *Serratia marcescens* em outros hospitais no Japão (OSANO *et al.*, 1994). Um estudo de hibridização para triagem de 3.700 amostras de *P. aeruginosa* isoladas entre 1992 e 1994 em 17 hospitais japoneses, com sondas *bla*<sub>IMP-1</sub>, caracterizou 15 amostras positivas em 5 hospitais de diferentes áreas geográficas. Esses isolados apresentaram uma grande variação na CIM para o Imipenem, variando de 2 µg/ml a 128 µg/ml, o que sugere que a aquisição de MβL isoladamente não confere resistência aos carbapenêmicos (SENDA, 1996). Variantes IMP foram caracterizadas no Japão (IPM-3, IMP-6 e IMP10), apresentando substituições em apenas um aminoácido, o que resultava em alterações na atividade enzimática. A posição do aminoácido modificado observado na IMP-3 e IMP-6 correspondem ao aminoácido (glicina) encontrado em uma MβL inata a BCII, gerando a hipótese de que a IMP-3 poderia ser a progenitora da IMP-1 (apud WALSH *et al.*, 2005).

Inúmeras variantes IMP têm sido descritas em várias partes do mundo. Entre os últimos relatos de variantes estão a IMP-18 em *P. aeruginosa* no México e a IMP-19 em *Aeromonas caviae* na França (GARZA-RAMOS *et al.*, 2008; NEURWITH *et al.*, 2007). No Brasil, o estudo de isolados coletados pelo programa de vigilância de resistência a antimicrobianos SENTRY, identificou um novo alelo IMP, *bla*<sub>IMP-16</sub> (MENDES *et al.*, 2004). Recentemente, *P. aeruginosa* produtora de IMP-18 foi descrita em Salvador, mostrando que estes determinantes de resistência não estão restritos a determinadas áreas, sugerindo que microbiota não-fermentadora ambiental poderia ser a fonte destes elementos codificadores de resistência (XAVIER *et al.*, 2006).

### **VIM - Verona Imipenemase**

VIM-1 foi descrita pela primeira vez em Verona, Itália, a partir de um isolado de *P. aeruginosa* (LAURETTI *et al.*, 1999). Este isolado, recuperado em 1997, apresentou resistência a uma série de β-lactâmicos, incluindo ceftazidima, imipenem (CIM > 128 µg/m), e aztreonam. A resistência ao aztreonam neste isolado foi relacionada a outros mecanismos como bombas de efluxo e superprodução de cefalosporinases. A análise bioquímica feita do extrato cru da cultura revelou atividade hidrolítica de carbapenêmicos, que era inibida pelo EDTA e restaurada pela adição de zinco. O gene para β-lactamase foi clonado e a sequência deduzida

de aminoácidos revelou uma pré-proteína com 266 aminoácidos, bastante diferente das outras metalo-enzimas. A maior similaridade foi observada com a BCII de *B. cereus*, apresentando apenas 39% de identidade entre os aminoácidos. Similar ao *bla*<sub>IMP1</sub>, o *bla*<sub>VIM1</sub> era carregado por um gene cassete inserido em um *integron* de classe 1, localizado no cromossomo de *P. aeruginosa* VR-143/97 (LAURETTI *et al.*, 1999). A subclasse VIM é mais prevalente na Europa, segundo Horianopoulou (2006) mais de 12 variantes já foram descritas, entre elas, VIM-2 na França (DOCQUIER *et al.*, 2003), VIM-3 em Taiwan (YAN *et al.*, 2002), VIM-4 na Grécia (GISKE *et al.*, 2003), VIM-5 na Turquia (BAHAR *et al.*, 2004), VIM-6 em Singapura (KOH *et al.*, 2004), VIM-7 nos EUA (TOLEMAN *et al.*, 2004) e VIM-8 na Colômbia (CRESPO, 2004).

A comparação dos *integrons* de classe 1 associados a genes cassetes em isolados de *P. aeruginosa* produtoras de VIM-2 no sistema de saúde da região de Calgary, Canadá, mostrou pouca similaridade com as estruturas associadas à *integrons* descritas previamente em Portugal, sugerindo que a emergência de *P. aeruginosa* produtora de VIM-2 ocorreu independentemente em diferentes partes do mundo (PITOUT *et al.*, 2007). Uma análise de 36 isolados de *P. aeruginosa* produtores de M $\beta$ L tipo VIM em 15 hospitais na Grécia mostrou a presença do gene *bla*<sub>VIM</sub> associado à *integrons* de classe 1 de vários tamanhos; o seqüenciamento do DNA destas estruturas identificou o gene cassete *bla*<sub>VIM-2</sub> em uma variedade de estruturas de *integrons*. A diferença observada no tamanho e estrutura dos *integrons* pode refletir a evolução de um *integron* index ou a aquisição de cassetes *bla*<sub>VIM</sub> por diferentes *integrons* (GIAKKOUPIS *et al.*, 2003).

### **SPM-1 - São Paulo metalo- $\beta$ -lactamase**

Toleman e colaboradores descreveram a terceira subclasse de M $\beta$ L adquirida, SPM-1, isolada em 1997 de amostra clínica de *P. aeruginosa* no complexo Hospital São Paulo/UNIFESP (TOLEMAN *et al.*, 2002). Quando a seqüência da SMP-1 foi comparada com as de outras M $\beta$ Ls, a maior identidade foi encontrada para a IMP-1 (35,5%). A seqüência da SPM difere significativamente de ambas IMP e VIM, apresentando uma inserção de 24 aminoácidos logo após o sítio ativo. Esta inserção mostrou ser muito flexível e atua como um alça, provavelmente aumentando a ligação e hidrólise do  $\beta$ -lactâmico (WALSH, 2005). O gene *bla*<sub>SPM-1</sub> não está associado à *integrons* e transposons, mas ao elemento CR (região comum), fazendo parte de uma ilha de patogenicidade genômica móvel encontrada



em um plasmídeo de aproximadamente 180 kb, altamente relacionada com *Salmonella* entérica sorovar *typhimurium* (POIREL *et al.*, 2004). Comparados a *integrons* e transposons, mas muito menores, os elementos CR facilitam a mobilização de genes (WALSH *et al.*, 2005). O *bla*<sub>SPM-1</sub> foi descrito somente em *P. aeruginosa*, e diferentemente das outras MβLs de disseminação mundial, a SPM-1 até o momento parece estar disseminada exclusivamente no território brasileiro (GALES *et al.*, 2003; POIREL *et al.*, 2004; ZAVASCKI *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2006; PELLEGRINO *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2007).

### **GIM-1 - German Imipenemase**

Uma nova classe de MβL foi descrita em 2002, denominada GIM-1 (German imipenemase) (CASTANHEIRA *et al.*, 2004). Cinco isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos foram recuperados de diferentes pacientes internados na mesma ala de um hospital em Dusseldorf, Alemanha. Estes isolados mostraram-se idênticos por análise de eletroforese de campo pulsado. A seqüência de aminoácidos de GIM-1 teve baixa identidade com outros genes de MβLs de significância clínica, e a maior similaridade foi observada com IMP-6 (43.5%) IMP-1/IMP-4 (43.1%), seguido por VIM-7 (31,2%) e SPM-1 (28%). Da mesma forma que a maioria das MβLs, o gene *bla*<sub>GIM-1</sub>, foi encontrado na primeira posição de um *integron* de classe 1 (In77), sendo carregado em um pequeno plasmídeo não conjugativo (~22kb). Este *integron* também ancorava três outros genes de resistência, dois para aminoglicosídeos *aacA4* e *aadA1* e um gene para β-lactamase *bla*<sub>OXA-2</sub>; entretanto, devido à estrutura deste *integron*, provavelmente o gene OXA-2 não pode ser expresso, visto que não carrega seu próprio promotor (CASTANHEIRA *et al.*, 2004).

A produção de uma nova MβL por estes isolados pode ser um sinal de problemas clínicos no futuro, com estas e outras cepas similares. Entretanto, na forma que se apresenta, o gene GIM-1 pode não ser tão móvel quanto aqueles codificados por MβL VIM e IMP, pois o *integron* (In77) é carregado por um plasmídeo não conjugativo e parece ter uma gama de hospedeiros restritos (CASTANHEIRA *et al.*, 2004).

### **SIM-1 - Seoul Imipenemase**

Um novo gene para MβL adquirida denominado *bla*<sub>SIM-1</sub> foi detectado em sete isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, entre 2003 e 2004 na Coreia do Sul. Estava ancorado em um *integron* de classe 1, que carregava outros cassetes

com o gene *arr-3* (uma rifampicina ADP ribosiltransferase) e o gene *catB3* (uma cloranfenicol-acetiltransferase), que raramente são encontrados em *integrans* que codificam M $\beta$ Ls (LEE b *et al.*, 2005).

A enzima SIM-1 é uma nova subclasse de M $\beta$ L B1 e apresentou maior similaridade com as enzimas tipo IMP (69% de identidade com IMP-12 e 64% com IMP-9). Análises com sondas *bla*<sub>SIM-1</sub> sugeriram que o gene estava localizado no cromossomo. A eletroforese de campo pulsado identificou dois clones entre os sete isolados, que apresentaram aparentemente o mesmo *integron*, indicando que pode ocorrer transferência horizontal deste gene (LEE b *et al.*, 2005).

Assim, as M $\beta$ L pertencentes ao grupo 3 de Bush ou à classe B de Ambler, são enzimas que hidrolisam a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos comercialmente disponíveis, com exceção do aztreonam. Apresentam a mesma estrutura tridimensional, necessitam de dois íons divalentes (zinco) como co-fator para atividade catalítica e possuem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com os íons (Figura 2). Este grupo de enzimas é caracterizado ainda, por não sofrer ação dos inibidores das serina  $\beta$ -lactamases disponíveis comercialmente, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BUSH, 1998; MURPHY *et al.*, 2003; WALSH *et al.*, 2005).

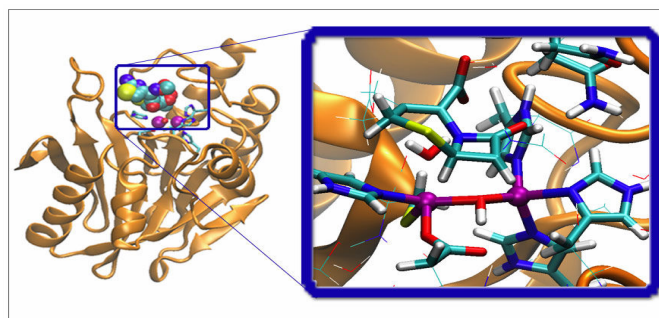


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE M $\beta$ L. EM DETALHE A INTERAÇÃO DO B-LACTÂMICO COM OS ÍONS ZINCO (ESFERA PÚRPURA) NO SÍTIO ATIVO DA ENZIMA.

FONTE: Dal Peraro and Klein (2006)

### 2.3.2.3 Inibidores de M $\beta$ Ls

Uma variedade de compostos diferentes tem sido examinados como inibidores de M $\beta$ Ls, incluindo derivados de tioéster, tióis, sulfonil-hidrazonas,

produtos tricíclicos naturais. Entretanto, ainda não foram encontrados compostos com capacidade de inibir a enzima e apresentar baixa toxicidade em humanos como o clavulanato, inibidor de serina  $\beta$ -lactamase, que está sendo utilizado para potencialização terapêutica de  $\beta$ -lactâmicos desde 1980.

Walsh e colaboradores, na extensa revisão sobre M $\beta$ L (2005), listam os principais obstáculos encontrados na busca de inibidores para estas enzimas: 1º- as M $\beta$ LS possuem uma variação sutil mas significativa na arquitetura de seu sítio ativo; assim, se torna muito difícil o desenho de um único inibidor eficaz contra todas as M $\beta$ LS transferíveis; 2º- o ácido clavulânico interage diretamente com enzimas de classe A e forma um intermediário covalente estável, enquanto as M $\beta$ LS não formam intermediários altamente estáveis; 3º- muitos estudos têm utilizado uma gama de compostos para inibir esta enzima a nível cinético, poucos têm examinado a potencialização destes compostos com potentes  $\beta$ -lactâmicos em *P. aeruginosa* contendo genes M $\beta$ LS, demonstrando que afinidade adequada do inibidor pela enzima não necessariamente corresponde à diminuição na CIM na presença de um  $\beta$ -lactâmico anti-pseudomonas; 4º- parte do sucesso do ácido clavulânico se deve ao fato dele não possuir nenhum alvo homólogo em mamíferos, ou seja, relativamente baixa toxicidade. Infelizmente as M $\beta$ LS têm o sítio ativo similar a enzimas de mamíferos, essenciais para o funcionamento celular. Como exemplo a glicoxalase II, uma tioesterase essencial ao catabolismo do tóxico 2-oxoaldeído. Compostos desenhados para inibir as enzimas VIM, IMP, e SPM não poderiam interagir com a glicoxalase II humana (WALSH *et al.*, 2005).

#### 2.3.2.4 Detecção de M $\beta$ LS

Não há método fenotípico padronizado para detecção de M $\beta$ L e os critérios dos testes são dependentes do gênero da bactéria a ser triada. Por exemplo, as enterobactérias que carregam genes de M $\beta$ LS podem ser sensíveis aos carbapenêmicos, com CIM entre 1 e 2  $\mu$ g/ml (SCOULICA *et al.*, 2004), já a presença desses genes em *P. aeruginosa* geralmente leva a altos níveis de resistência com CIM >32  $\mu$ g/ml (LIVERMORE, 2002, TOLEMAN *et al.*, 2002). *P. aeruginosa* produtora de M $\beta$ LS apresenta CIM para carbapenêmicos muito maiores do que o observado para enterobactérias produtoras de metalo-enzima devido, provavelmente, à

contribuição de mecanismos de resistência adicionais, incluindo alto nível de produção de AmpC desreprimida e possivelmente diminuição de porinas OprD (LAURETTI *et al.*, 1999).

Assim, a implantação de placas de triagem para detectar M $\beta$ LS, como têm sido utilizadas para ESBL, MRSA e VRE, deve levar em conta o gênero da bactéria. Para enterobactérias a triagem poderia utilizar ceftazidima e ceftazidima com Ácido etilenodiaminotrecético (EDTA), mas a presença freqüente de outras  $\beta$ -lactamases interferiria no teste.

A identificação de algumas  $\beta$ -lactamases tem sido feita por determinação do ponto isoelétrico. Esta técnica é baseada na mudança da carga de superfície da enzima, que é neutralizada a um determinado pH. As M $\beta$ LS têm diferenças consideráveis uma da outra, sendo assim, esta técnica não é recomendada como uma ferramenta para identificá-las (WALSH *et al.*, 2005).

O “padrão ouro” não molecular é bem estabelecido em laboratórios de pesquisa, nos quais o extrato cru bacteriano é examinado quanto à sua habilidade de hidrolisar carbapenêmicos e se esta hidrólise é sensível ao EDTA. Esta técnica utiliza equipamentos espectrofotométricos especializados, o que dificulta sua implantação no laboratório de rotina (WALSH *et al.*, 2005).

Devido ao fato que todas as M $\beta$ LS são inibidas pela remoção do zinco de seu sítio ativo, sua detecção deveria ser simples e estudos têm se valido deste princípio utilizando uma variedade de combinações de quelantes de zinco e antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos para detectar a presença destas enzimas. Nas metodologias fenotípicas a zona de confluência entre o quelante de zinco e o substrato enzimático difundidos no ágar, é caracterizada pela inibição do crescimento bacteriano. Na falta do co-fator, a enzima perde sua habilidade de clivar o anel beta-lactâmico, levando à formação de “zonas fantasmas” (inibição do crescimento) ou aumento no tamanho dos halos de inibição.

Técnicas de dupla difusão em ágar e de discos combinados são as mais utilizadas na busca de uma metodologia que detecte as subclasses de M $\beta$ LS nos diversos gêneros bacterianos (ARAKAWA *et al.*, 2000; YAN *et al.*, 2004; DOLARA *et al.*, 2005). Entretanto estas enzimas variam no nível de inibição com certos compostos e também na habilidade de conferir resistência à ceftazidima e imipenem, dois substratos normalmente utilizados na triagem de M $\beta$ LS. Enterobactérias que possuem M $\beta$ LS são geralmente intermediárias ou sensíveis aos carbapenêmicos

(SCOULICA *et al.*, 2004), e podem ser não identificadas quando se utiliza imipenem ou meropenem no método de detecção. O Etest® disponível comercialmente para detecção de M $\beta$ L utiliza imipenem/EDTA. Esta metodologia foi capaz de diferenciar os isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. produtores de M $\beta$ L (LEEa *et al.*, 2005), mas falhou na detecção destas enzimas em bacilos gram-negativos sensíveis aos carbapenêmicos (YAN *et al.*, 2004). Utilizar EDTA em combinação com imipenem para triagem em *P. aeruginosa* pode levar a resultados falso-positivos porque algumas amostras M $\beta$ L-negativas produzem redução da CIM do imipenem na presença de EDTA, devido ao efeito do zinco na OprD e ao sistema CzcR-CzcS (CONEJO *et al.*, 2003; PERRON, 2004). Lee e colaboradores recomendam uma triagem prévia das amostras resistentes ao IMP e/ou CAZ com o teste de Hodge, adicionando sulfato de zinco ao disco de IMP, para determinar os efeitos dos íons zinco no teste (LEE *et al.*, 2003).

Estudo recente de Franklin e colaboradores (2006) testou 84 isolados de bacilos gram-negativos, enterobactérias, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. tanto resistentes quanto sensíveis aos carbapenêmicos, produtores de M $\beta$ L (IMP-1, IMP-4, VIM-2, VIM-4), utilizando três metodologias. Avaliadas separadamente, as metodologias de discos combinados imipenem/EDTA e aztreonam/EDTA apresentaram sensibilidade de 100% e especificidade de 98%. A dupla difusão em ágar, utilizando disco de imipenem a 20 mm do disco de EDTA teve sensibilidade de 79% e especificidade de 98%. O estudo utilizou um inóculo menor de microrganismos (1/10 da diluição 0.5 McFarland) e uma concentração menor de EDTA (292  $\mu$ g). O ponto de corte utilizado para o disco combinado foi 4 mm, ao invés dos 7 mm utilizados em outros estudos, e os autores relataram 12 isolados produtores de M $\beta$ L com aumento de zona < 7 mm, 11 dos quais eram enterobactérias. Outro ponto interessante foi a sensibilidade do método em detectar isolados produtores de M $\beta$ L sensíveis aos carbapenêmicos, fenótipo emergente principalmente entre enterobactérias. A utilização de várias metodologias maximizou a detecção para cada microrganismo testado (FRANKLIN *et al.*, 2006). Portanto, não há uma combinação inibidor/ $\beta$ -lactâmico ideal para detectar todas as M $\beta$ LS transferíveis (WALSH *et al.*, 2005).

Métodos moleculares têm sido utilizados para pesquisar os genes que codificam as M $\beta$ LS e os *integrans* nos quais estes genes estão inseridos. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sondas de DNA são os mais freqüentemente

utilizados. A maior dificuldade em relação a essas metodologias está na necessidade de se conhecer o gene que está sendo pesquisado permitindo o desenho de *primers* específicos. Além disso, esses métodos não indicam o tipo de variante, somente a subclasse de MβL. Para determinar a variante é necessário realizar o seqüenciamento do produto da PCR. Inicialmente, as principais subclasses eram pesquisadas individualmente por *primers* específicos à medida que foram sendo caracterizadas (WATANABE *et al.*, 1991; LAURETTI *et al.*, 1999; TOLEMAN *et al.*, 2002; CASTANHEIRA *et al.*, 2004; LEEb *et al.*, 2005). Atualmente, PCR multiplex e PCR multiplex em tempo real, estão disponíveis para detectar e identificar todas as MβLs descritas em uma única reação (ELLINGTON *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2007), tornando o ensaio rápido e diminuindo os custos. Estas metodologias podem ser aplicadas em todas as bactérias gram-negativas. São facilmente interpretadas, pois os amplicons gerados apresentam tamanhos bem diferenciados, tanto para a técnica padronizada por Ellington e colaboradores (2007) (SIM 570pb, GIM 477pb, variantes VIM 390pb, SPM 271pb e variantes IMP 188pb) como para a padronizada por Mendes e colaboradores (2007) (SPM 798pb; SIM 569pb; variantes de VIM 382pb; variantes de IMP 188pb; GIM 72pb).

A despeito das metodologias moleculares padronizadas para detecção de MβL, o laboratório de microbiologia ainda espera pela padronização de técnicas fenotípicas para utilização na rotina.

## 2.4 DISSEMINAÇÃO DE *P. aeruginosa* PRODUTORA DE MβL NO BRASIL

O primeiro relato de *P. aeruginosa* produtora de MβL no Brasil foi publicado em 2002 por Pellegrino e colaboradores. O estudo analisou amostras de *P. aeruginosa* de quatro hospitais do Rio de Janeiro, isoladas entre 1999 e 2000, e a presença de MβL em isolados multirresistentes foi determinada por metodologia fenotípica. Os autores descreveram a disseminação de *P. aeruginosa* multirresistente com um único genótipo determinado por PFGE nos diferentes hospitais estudados, o clone A (PELLEGRINO *et al.*, 2002).

No mesmo ano, Toleman e colaboradores caracterizaram uma nova subclasse de MβL, SPM-1. Conforme descrito anteriormente, esta enzima foi

encontrada em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada no Complexo Hospital São Paulo/UNIFESP em 1997 (TOLEMAN *et al.*, 2002).

Em 2003, Gales e colaboradores avaliaram isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes recuperados em hospitais de distintas regiões brasileiras (Bahia, Ceará, Distrito Federal, Paraná e São Paulo). Os autores relataram a emergência e disseminação de um clone epidêmico nos hospitais de todos os estados avaliados, que recebeu a denominação de clone SP (São Paulo). Entre as 16 amostras avaliadas no estudo, 15 eram produtoras de SPM-1 (GALES *et al.*, 2003).

O relato de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 em isolados clonais de diversos hospitais de Recife ocorreu em 2004. Este estudo contribuiu com a caracterização da região comum (CR4) responsável pela mobilização e expressão de *bla*<sub>SPM-1</sub>, conforme descrito anteriormente (POIREL *et al.*, 2004).

Uma nova variante IMP, a IMP-16, foi caracterizada em *P. aeruginosa* multirresistente isolada em um hospital terciário de Brasília (MENDES *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2006).

Sader e colaboradores relataram que uma a cada cinco *P. aeruginosa* isoladas em hemoculturas no complexo Hospital São Paulo, nos anos 2000 e 2001, produziam algum tipo de M $\beta$ L transferível. A maior parte delas foi classificada como SPM-1 (55,6%), seguida por VIM-2 (30,6%) e IMP-1 (8,3%). A análise da similaridade genética mostrou diversidade clonal entre os isolados, sendo caracterizada disseminação clonal por tipo de enzima produzida em apenas alguns casos (SADER *et al.*, 2005).

Em 2005, Zavascki e colaboradores descreveram um surto de *P. aeruginosa* multirresistente em um hospital-escola no Rio Grande do Sul. Entre os 135 isolados analisados, 21 carregavam o gene *bla*<sub>SPM-1</sub>, a tipificação molecular revelou a presença de um clone com quatro subtipos entre estas amostras (ZAVASCKI *et al.*, 2005).

Em 2006, Marra e colaboradores relataram a análise de amostras de *P. aeruginosa* isoladas em hemoculturas entre 2000 e 2002, em um hospital no estado de São Paulo. Entre as 76 amostras incluídas no estudo, quatro apresentaram o gene *bla*<sub>SPM-1</sub>, duas o gene *bla*<sub>IMP-1</sub> e uma o gene *bla*<sub>IMP-16</sub> (MARRA *et al.*, 2006).

A caracterização de amostras de *P. aeruginosa* multirresistentes isoladas em um hospital-escola do Rio de Janeiro, entre 2000 e 2001, demonstrou a presença do

gene *bla*<sub>SPM-1</sub> em 20% dos isolados e constatou que todos pertenciam ao clone SP já descrito em diversos estados brasileiros (CARVALHO *et al.*, 2006).

Em 2007, Martins e colaboradores publicaram a pesquisa de M $\beta$ L em *P. aeruginosa* isoladas em dois hospitais-escola de Porto Alegre. Entre as 92 amostras analisadas, 18 foram caracterizadas como SPM-1-*like* e 5 isolados como IMP-1-*like* sendo que 3 destas amostras eram sensíveis ao Imipenem. Os isolados SPM-1-*like* compreendiam um único clone e os isolados IMP-1-*like* pertenciam a outro clone (MARTINS *et al.*, 2007).

## 2.5 TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *P. aeruginosa* MULTI-RESISTENTES

A suspeita de infecção por *P. aeruginosa* requer documentação bacteriológica, incluindo perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, não se devendo confiar completamente no tratamento empírico. Outro ponto importante é que a terapia seja iniciada logo após a coleta da amostra clínica, utilizando-se a melhor opção conhecidamente disponível para cobrir o patógeno suspeito. O início precoce da terapia está associado com melhores resultados. O descalonamento e/ou ajuste da terapia deve ser mandatório assim que os dados laboratoriais estejam disponíveis. Segundo Mesaros e colaboradores, estes são passos críticos para limitar a pressão antimicrobiana, e conseqüentemente a seleção da resistência que freqüentemente ocorre durante a terapia e pode levar a resultados clínicos desfavoráveis. Por fim, as condições do paciente devem ser reavaliadas regularmente, com medidas apropriadas, para decidir se o antimicrobiano deve ser continuado (MESAROS *et al.*, 2007).

*P. aeruginosa* apresenta notável capacidade de resistência aos antimicrobianos, seja intrinsecamente (expressão constitutiva de  $\beta$ -lactamases e bombas de efluxo, combinadas com diminuição de permeabilidade da membrana externa) ou por aquisição de genes de resistência (genes para  $\beta$ -lactamases, ou enzimas inativadoras de aminoglicosídeos ou modificação de seus alvos), super-expressão de bombas de efluxo, diminuição da expressão de porinas, ou mutações nos alvos das quinolonas (HANCOCK, 1998; MESAROS *et al.*, 2007). A



multirresistência pode ser facilmente observada como resultado da combinação de mecanismos de resistência (WALSH *et al.*, 2005).

Infecções causadas por *P. aeruginosa* são geralmente associadas à alta mortalidade apesar da terapia antimicrobiana adequada (LIVERMORE, 2002). Estudos têm mostrado que infecções por *P. aeruginosa* produtora de M $\beta$ L resultam em mortalidade maior do que as infecções causadas por isolados não produtores destas enzimas (LAUPLAND *et al.*, 2005; ZAVASCKI *et al.*, 2006).

Os isolados de *P. aeruginosa* M $\beta$ Ls positivos são geralmente resistentes a  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas; entretanto, eles geralmente permanecem sensíveis à Polimixina (WALSH *et al.*, 2005). As polimixinas, representadas pela polimixina B e a colistina, atuam na parede celular de bactérias gram-negativas, alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática, levando à morte celular. Estes antimicrobianos deixaram de ser comercializados no Brasil no início dos anos 80 devido à sua alta toxicidade (LEVIN *et al.*, 1999). Contudo, recentes estudos têm afirmado que a polimixina não é tão tóxica quanto previamente se pensava (MARKOU *et al.*, 2003; PARKINS *et al.*, 2007). Esta droga mostra uma atividade bactericida concentração-dependente e tem sido reintroduzida para tratamento de infecções por *P. aeruginosa* e *A. baumannii* multirresistentes (LEVIN *et al.*, 1999; LINDEN *et al.*, 2003; MESAROS *et al.*, 2007). Alguns estudos têm relatado os resultados desta reintrodução da polimixina B para tratamento de infecções por bacilos gram-negativos multirresistentes. Levin e colaboradores afirmaram que esta pode ser uma boa opção terapêutica para infecções graves causadas por *P. aeruginosa* e *A. baumannii* multirresistentes, entretanto, os autores descreveram a falha renal como principal efeito adverso ao tratamento (LEVIN *et al.*, 1999). Linden e colaboradores relataram resposta clínica favorável ao tratamento com colistina em 61% dos pacientes com infecções graves por *P. aeruginosa* multidroga-resistentes (LINDEN *et al.*, 2003). Um estudo *in vitro* sugere o sinergismo da polimixina quando associada à rifampicina (GIAMARELLOS-BOURBOULIS *et al.*, 2003). Motaoauakkil e colaboradores testaram a associação polimixina/rifampicina em infecções graves por *A. baumannii* multirresistente e observaram evolução clínica favorável em todos os pacientes. Apesar da falta de grupo controle e do limitado número de pacientes, os autores acreditam que os resultados parecem ser encorajadores (MOTAOUAKKIL *et al.*, 2006). Mais recentemente, Bassetti e colaboradores relataram resposta clínica e microbiológica em 76% dos casos de

infecções graves por *A. baumannii* multirresistentes tratadas com esta associação (BASSETTI *et al.*, 2008).

Corvec e colaboradores descreveram um surto prolongado de *P. aeruginosa* produtora de M $\beta$ L em um hospital universitário francês (1996 a 2004). Com base nestes dados sugeriram que, na ausência de um guia terapêutico, piperacilina/tazobactam e aztreonam poderiam ser opções confiáveis para tratamento destas infecções (CORVEC *et al.*, 2007).

A alta sensibilidade de *P. aeruginosa* produtora de M $\beta$ L a piperacilina/tazobactam (95%) na região de Calgary, Canadá, tornou este antimicrobiano o principal suporte na maioria dos regimes de tratamento de infecções causadas por este microrganismo entre 2002 e 2004. Nos 46 pacientes tratados adequadamente com este agente, 29 como droga única, a sobrevida foi de 80,4% (PARKINS *et al.*, 2006). A sensibilidade de amostras de *P. aeruginosa* multirresistentes à Piperacilina/Tazobactam também foi relatada em outros estudos (LAUPLAND *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005).

Belais e colaboradores (2002) descreveram um estudo utilizando modelo de pneumonia por *P. aeruginosa* produtora de M $\beta$ L em rato, mostrando que ratos tratados com doses baixas de aztreonam tiveram contagem bacteriana no pulmão similar a dos animais não tratados. A falha na atividade antibacteriana de baixas doses de aztreonam não pode ser explicada por concentrações inadequadas no plasma, pois esta permaneceu acima da CIM. Neste mesmo estudo, animais tratados com doses de imipenem maiores que as recomendadas para humanos, reduziram significativamente o título bacteriano no pulmão, apesar destes isolados serem resistentes ao imipenem (BELLAIIS *et al.*, 2002).

Em revisão sobre opções terapêuticas para *P. aeruginosa* multirresistente, Mesaros e colaboradores mencionam as novas drogas que estão em fase III de estudo clínico, uma cefalosporina de amplo espectro (ceftobiprol), um novo carbapenêmico (doripenem) e uma nova fluoroquinolona (sitafloxacin). Os autores relatam, entretanto, que estas drogas não têm sido examinadas especificamente para suas atividades anti-pseudomonas. O ceftobiprol, desenhado especificamente para atuar contra *S. aureus* resistente à oxacilina, tem apresentado CIMs para *P. aeruginosa* semelhantes às do cefepime, no entanto o estudo clínico do ceftobiprol não incluiu pacientes com infecções por esse microrganismo. O doripenem, derivado do meropenem, mostrou aumento na atividade contra *P. aeruginosa*, mas

também está sujeito a efluxo pelo sistema MexAB-OprM. Sitafloracin tem atividade comparável à do ciprofloxacino em cepas selvagens de *P. aeruginosa*, mas apresenta CIMs menores para as mutantes *gyrA* e *parC*, provavelmente por causa da melhor afinidade pelo alvo mutado. A tigeciclina, o único antimicrobiano de amplo espectro lançado recentemente, é inativa contra *P. aeruginosa* por causa do efluxo mediado por indução do sistema MexXY-OprM (apud MESAROS *et al.*, 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

O presente estudo incluiu amostras bacterianas de *P. aeruginosa*, isoladas de diversos materiais clínicos, encaminhados para cultura ao Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, no período de junho de 2003 a junho de 2005. Foram selecionados todos os isolados resistentes aos carbapenêmicos e alguns isolados sem perfil de multirresistência. As culturas foram processadas conforme a rotina do setor, baseadas no manual de procedimentos da Sociedade Americana de Microbiologia (ASM) (ISENBERG, 2004). A identificação bacteriana, seguindo o manual, teve como principais características o odor de frutas, reação de oxidase positiva, crescimento em ágar cetrimide a 42°C e produção de pigmento. O perfil de suscetibilidade foi inicialmente determinado pelo método de disco-difusão conforme critérios determinados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Todos os isolados de *P. aeruginosa* selecionados foram inoculados em caldo Tripticase-Soja (TSB) com 20% (vol/vol) de glicerol, e acondicionados a -70° C até o momento do uso.

Os isolados foram identificados com o número seqüencial desvinculado do protocolo do laboratório, não sendo possível a identificação do paciente; apenas a idade do mesmo foi registrada. Foi relacionado ainda o tipo de amostra clínica na qual o microrganismo foi isolado e a origem (unidades de internação para pacientes hospitalizados ou emergência) (ANEXO 1).

#### 3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A Concentração Inibitória Mínima (CIM), menor concentração de um antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível de um microrganismo, foi determinada pelo método de diluição em ágar. O procedimento foi realizado

segundo normas do CLSI 2006 (M7-A7), submetendo-se um inóculo bacteriano de concentração padronizada a concentrações crescentes de antimicrobiano. Após 18 a 24 horas de incubação em estufa a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , verificou-se o crescimento do microrganismo. O controle de qualidade do método foi realizado utilizando-se a cepa referência ATCC *P. aeruginosa* 27853.

### 3.2.1 Agentes Antimicrobianos Utilizados

Os sais antimicrobianos utilizados apresentavam no rótulo o nome genérico da droga, potência (expressa, em geral, em microgramas [ $\mu\text{g}$ ] ou Unidades Internacionais [UI] por mg de sal) e data de validade. Foram armazenados seguindo as instruções do fabricante, em dessecador entre  $2^\circ$  e  $8^\circ\text{C}$ .

As soluções-estoque foram preparadas seguindo a equação:

$$\frac{\text{Peso (mg)}}{\text{Potência (}\mu\text{g/mg)}} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração (}\mu\text{g/mL)}}{}$$

A concentração da solução estoque (Tabela 1) foi determinada como duas diluições acima da concentração considerada resistente pelo documento M100 S-17 (CLSI 2007). As soluções-estoque foram esterilizadas por filtração em membrana de  $0,22 \mu$ , acondicionadas em criotubos, armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento do uso, com validade de 6 meses.

TABELA 1 - CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE E CONCENTRAÇÕES TESTADAS DOS ANTIMICROBIANOS PARA DETERMINAÇÃO DA CIM EM ISOLADOS DE *P. aeruginosa*

ANTIMICROBIANOS	CONCENTRAÇÕES	
	Estoque ( $\mu\text{g/ml}$ )	Utilizadas ( $\mu\text{g /ml}$ )
Amicacina	12800	0,5 – 128
Aztreonam	12800	0,06 – 128
Cefepime	12800	0,015 – 128
Ceftazidima	12800	0,06 – 128
Ciprofloxacino	1600	0,004 – 16
Gentamicina	3200	0,25 – 32
Imipenem	6400	0,25 – 64
Meropenem	6400	0,25 – 64
Pipe/Tazobactam	51200/4	16/4 – 512/4
Polimixina B	3200	0,25 – 32

### 3.2.2 Diluição do Antimicrobiano em placas de Ágar Müller-Hinton

Partindo da solução-estoque, foram feitas diluições seriadas do antimicrobiano em soro fisiológico (NaCl 0,9%). Alíquotas de 49 ml de ágar Müller-Hinton, preparadas seguindo as instruções do fabricante, foram mantidas em banho-maria a 50°C após a autoclavação. As diluições dos antimicrobianos foram adicionadas ao ágar liquefeito, homogeneizadas por inversão, e este foi distribuído em placas de Petri descartáveis de 150 x 15 mm, obtendo-se uma camada de 3 a 4 mm de espessura. Após solidificação, as placas foram protegidas por filmes plásticos, acondicionadas em geladeira (2° a 8°C) e utilizadas 24 horas após o preparo.

### 3.2.3 Preparo do Inóculo Bacteriano

Os inóculos bacterianos foram preparados por suspensão direta, em soro fisiológico (NaCl 0,9%), de colônias isoladas em placa de ágar não seletivo com 18 a 24 horas de crescimento. A turvação da suspensão foi ajustada utilizando-se um densitômetro Densimat (Biomérieux) com comprimento de onda de 625 nm, padronizado para a escala de McFarland. Inicialmente todos os inóculos foram ajustados para a escala 0,5, que contém aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, e esta solução foi então diluída 10 vezes (1:10) em soro fisiológico (NaCl 0,9%). A concentração final do inóculo padronizada pelo CLSI ( $10^4$  UFC/ml), foi obtida partindo desta solução contendo  $10^7$  UFC/mL, utilizando o multi-inoculador de Steer com 96 pinos (Figura 3), que dispensa aproximadamente 2 µL de solução por pino.

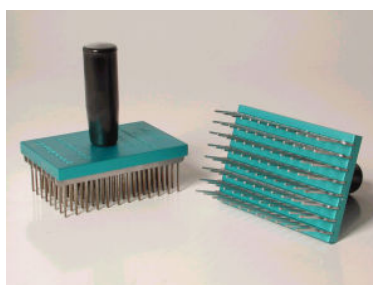


FIGURA 3 - MULTI-INOCULADOR DE STEER UTILIZADO PARA DISPENSAR O INÓCULO BACTERIANO EM PLACA DE ÁGAR MULLER-HINTON.

FONTE: ITO (2004)

### 3.2.4 Inoculação Bacteriana em Ágar

Os inóculos bacterianos ( $10^7$  UFC/mL) foram distribuídos em alíquotas de 100 µl em placa de poliestireno de fundo chato com 96 poços, possibilitando a aplicação rápida e simultânea na superfície do ágar.

Utilizando o multi-inoculador de Steer, os inóculos bacterianos foram distribuídos na superfície do ágar Müller-Hinton, da menor para a maior concentração do antimicrobiano. Placas de Petry controle com ágar sem antimicrobiano foram utilizadas no início e no final de cada bateria, para verificar inicialmente a viabilidade de todas as amostras e por fim verificar contaminação ou transferência significativa de antimicrobiano durante a inoculação.

As placas inoculadas permaneceram à temperatura ambiente até que a umidade nos pontos de inoculação tivesse sido absorvida, no máximo por trinta minutos. Em seguida foram invertidas e incubadas em estufa a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 16-20 horas.

### 3.2.5 Interpretação da Concentração Inibitória Mínima

As placas de ágar Muller-Hinton inoculadas foram colocadas em uma superfície escura e não refletiva. A CIM foi registrada como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do microrganismo. Foi determinada a CIM 50: concentração do antibiótico em que 50% dos isolados teve seu crescimento inibido, e a CIM 90: concentração do antibiótico em que 90% dos isolados teve seu crescimento inibido.

## 3.3 MÉTODOS MOLECULARES

### 3.3.1 Extração do DNA para Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) e Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição (RFLP)

Os isolados bacterianos armazenados a  $-80^\circ\text{C}$  foram cultivados inicialmente em caldo Trypticase-Soja (TSB) e mantidos em estufa a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas e

reisolados em ágar MacConkey a  $35\pm 1^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas. Partindo de colônias isoladas foi preparada uma suspensão bacteriana com inóculo padrão de 0,5 na escala de MacFarland em caldo TSB e incubada por 18 a 24 horas em estufa a  $35\pm 1^\circ\text{C}$ . Transferiu-se 1 ml da suspensão bacteriana para um tubo tipo eppendorf que foi centrifugado por 1 min. a 13.000 rpm a temperatura ambiente. O sedimento foi misturado cuidadosamente a 1 ml de TE (Tris-EDTA) (ANEXO 7) e centrifugado a 3.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente.

O sedimento foi ressuspenso em tampão de extração e submetido à digestão com 30  $\mu\text{l}$  de Lisozima (50 mg/ml) (Invitrogen) em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Após este período, foram adicionados 5  $\mu\text{l}$  de Proteinase K (20 mg/ml) (Invitrogen), homogeneizado por inversão e incubado em bloco térmico a  $50^\circ\text{C}$  por 2 horas, com agitação a cada 30 minutos.

Foi adicionado igual volume de fenol e homogeneizado cuidadosamente por inversão durante 10 min.; o tubo foi centrifugado a temperatura ambiente a 13.000 rpm por 10 min., a fase aquosa foi transferida para outro tubo tipo eppendorf, e o mesmo procedimento foi repetido utilizando fenol-clorofórmio (1:1) e posteriormente clorofórmio puro. A fase aquosa obtida no final dessa extração continha o DNA que foi precipitado utilizando-se acetato de sódio 3 M pH 5.0 e etanol 95% a  $-20^\circ\text{C}$ . Para a precipitação a mistura foi incubada a  $-20^\circ\text{C}$  por 18 a 24 horas. Em seguida foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 minutos. Ao sedimento foi adicionado etanol 70% a  $-20^\circ\text{C}$ , sendo novamente centrifugado e o sobrenadante desprezado. Após secar naturalmente, foi adicionado ao sedimento de DNA 50  $\mu\text{l}$  de tampão TE pH 7.4 e incubado com RNase (10 mg/ml) por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . A seguir o DNA foi novamente precipitado com etanol a  $-20^\circ\text{C}$  conforme descrito e, solubilizado em tampão TE. A concentração de DNA foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm ( $1\text{DO} = 50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) e acondicionado a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do uso.

### 3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição (PCR-RFLP)

Após a extração do DNA, as amostras foram amplificadas com os *primers* 515 F e 1492 R, universais para a região 16S do rDNA de bactérias (RELMAN, 1993). Este PCR possibilitou além de verificar possíveis degradações do DNA



bacteriano durante o processo de extração que poderiam interferir no resultado do RAPD, semi-quantificar o DNA extraído através da intensidade do produto da PCR em gel de eletroforese e fornecer um substrato para a metodologia de RFLP

As reações de amplificação foram feitas para um volume final de 50 µl, e consistiam de tampão de enzima 10X (10 µM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), desoxinucleotídeos-trifosfato (dNTPs) 250 µM de cada (Biosystems), *primer* 515 (10 pmoles), *primer* 1492 (10 pmoles), água (39,85 µl), Taq-DNA-polimerase (1 U) (Invitrogen) e 1 µl do DNA molde (~40 ng). A amplificação seguiu o seguinte protocolo; 40 ciclos de 94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min, seguido por 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados pelo brometo de etídio 0,5µg/ml, visualizados sob iluminação ultravioleta utilizando-se um transiluminador UV e fotografados.

O produto da PCR amplificado com os primers 515F/1492R da região 16S do DNA ribossomal, foi submetido à clivagem com as enzimas de restrição *Bam* HI (Gibco BRL) e *Hae* III (Gibco BRL) para verificar polimorfismo no tamanho dos fragmentos gerados (RFLP).

Uma solução contendo tampão, enzima e água ultrapura esterilizada, nas proporções recomendadas pelo fabricante foi incubada a 37°C por uma noite com 10 µl do produto da PCR descrita anteriormente. Os fragmentos desta clivagem foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% (100 V por 60 min.), corados pelo brometo de etídio, visualizados em transiluminador UV e fotografados.

O padrão de PM utilizado foi HMW, DNA de fago lambda digerido com enzima *Pst*I (fragmentos: 11.490; 5.080; 4.790; 4.500; 2.840; 2.560; 2.450; 2.440; 2.130; 1.980; 1.700; 1.150; 1.090; 850; 516 pb); e LMW, DNA do plasmídeo pUC digerido com *Hae*III (fragmentos: 587; 458; 434; 298; 267; 257; 174; 102; 80; 18; 11 pb), preparados no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Como controle positivo foi utilizada cepa referência *P. aeruginosa* ATCC 25823 e como controle negativo o produto da PCR incubado sem enzima de restrição.

### 3.3.3 Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD)

O DNA bacteriano extraído conforme descrito no item 3.3.2 foi submetido à amplificação utilizando-se pequenos *primers*, únicos e desenhados para metodologia de RAPD (Quadro -1):

<b>PRIMER</b>	<b>SEQÜÊNCIA</b>
208	5' ACGGCCGACC 3'
272	5'-AGCGGGCCAA-3'
3303	5'- TCACGATGCA 3'
M13	AGTCACGACGTTGTA

QUADRO 1 – SEQÜÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA METODOLOGIA DE RAPD EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa*

As reações de amplificação foram feitas em um volume de 25 µl, que consistiram de tampão de enzima 10X (10µM), MgCl<sub>2</sub> (3mM), desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) 250 µM de cada, oligonucleotídeos *primers* 40 pmoles, água (18,6 µl), Taq-DNA-polimerase (1U) e DNA molde (40 ng). A amplificação seguiu o seguinte protocolo: 2 ciclos de 95°C 5 min, 30°C 2 min, 72°C 1 min, 33 ciclos de 95°C 30 seg, 40°C 1 min, 72°C 1 min, e 72°C por 5 min.

*P. aeruginosa* ATCC 25823 foi utilizada como controle positivo e como controle negativo foi incluída em cada amplificação, um tubo contendo todos os reagentes da PCR, exceto o DNA molde.

Os produtos do RAPD foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 4%, em 100 V, por 60 min, corados pelo brometo de etídio 0,5 µg/ml, e visualizados sob a luz ultravioleta em transiluminador UV e fotografados.

O tamanho relativo das bandas foi estimado com a utilização de marcadores de tamanho molecular (LMW e HMW *in house*).

### 3.3.4 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Nesta metodologia o DNA fixado em bloco de agarose foi submetido à digestão pela enzima *SpeI*, e os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese de campo pulsado.

#### 3.3.4.1 Preparo dos blocos com DNA

Os isolados bacterianos armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram cultivados inicialmente em Ágar Sangue a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas e reisolados em ágar TSA (Ágar Tripticase-Soja) a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas.

Utilizando-se 2 a 5 colônias isoladas, foi preparada uma suspensão bacteriana em 8 ml de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*). A suspensão foi incubada a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$  em estufa por 18 horas. Em seguida, foi centrifugada a 3.000 rpm por 20 min., o sobrenadante foi removido utilizando-se pipeta de Pasteur e o sedimento foi ressuspensão em 1 ml de tampão SE (soro fisiológico/EDTA) (ANEXO 7) e transferido para um tubo tipo eppendorf previamente pesado. O tubo contendo a suspensão bacteriana em tampão SE foi centrifugado a 14.000 rpm por 1 min. e o sobrenadante totalmente removido. O tubo foi pesado novamente e o peso do sedimento determinado pela diferença entre a primeira e a segunda pesagem. Foram adicionados 10  $\mu\text{l}$  de SE para cada 10 mg de sedimento obtendo-se uma massa final de 1 mg/ $\mu\text{l}$ . A mistura foi agitada vigorosamente em agitador do tipo vortex por 1 min. ou até sua total ressuspensão.

Foram diluídos 5  $\mu\text{l}$  da suspensão obtida a partir do *pellet* em 500  $\mu\text{l}$  de tampão SE. A esta solução foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de agarose de baixo peso molecular a 2%, a mistura foi mantida em banho-maria a  $56^{\circ}\text{C}$ . A solução final, homogeneizada em agitador do tipo vortex, foi distribuída em moldes de acrílico de aproximadamente 5 X 10 mm. A seguir os moldes foram colocados em geladeira por 30 min. para polimerização do ágar.

Os blocos polimerizados foram transferidos dos moldes para frascos contendo 3 ml de solução de proteinase K em tampão de extração de gram-negativo (ANEXO 7). Os frascos foram incubados a  $56^{\circ}\text{C}$  por 18 horas; após este período o tampão foi retirado utilizando-se pipeta de Pasteur, uma nova solução de proteinase

K foi adicionada e o frasco foi reincubado a 56°C por mais 18 horas. Os blocos foram lavados quatro vezes com tampão TE, permanecendo por 30 min. em geladeira entre cada troca de tampão. Foram então transferidos para criotubos contendo tampão TE e acondicionados em geladeira, por um período de até seis meses.

#### 3.3.4.2 Clivagem do DNA com Enzimas de Restrição

Uma parte do bloco de aproximadamente 4 mm foi cortada e selecionada para clivagem com a enzima *SpeI*. Esse pequeno bloco foi transferido para um tubo tipo eppendorf de 500 µl e imerso em tampão de enzima *SpeI*, permanecendo por no mínimo 30 min. Após esse período o tampão foi retirado e 100 µl de uma nova solução tampão contendo 10 U de enzima foi adicionada ao bloco que foi incubado a 37°C por 18 horas.

#### 3.3.4.3 Eletroforese em Gel de Agarose em Campo Pulsado

Foi preparado um gel de agarose a 1,2% (grau molecular) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) (ANEXO 7), utilizando o molde para 25 ou 12 amostras. Após a polimerização da agarose, por pelo menos 30 min., o gel foi carregado com os blocos, tomando o cuidado de encostá-los na parede anterior dos poços e evitando a formação de bolhas. A cada 12 amostras foi adicionado um padrão de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker, Biolabs). Os poços foram selados com agarose de baixo ponto de fusão a 2%.

A cuba de eletroforese foi carregada com 3 litros de TBE 0,5 % , e o módulo de resfriamento foi programado para 12°C. Após o tampão atingir a temperatura programada o gel foi colocado na cuba utilizando-se o molde e os fixadores.

O equipamento CHEF – DRIII (Biorad) foi programado para corrida com um ângulo de 120°, por 24 horas. Após este período o gel foi retirado da cuba, colocado em uma solução de brometo de etídio 0,5 µg/ml por 1 hora e 30 min., e fotografado em transiluminador sob luz ultravioleta.

### 3.3.5 Análise dos Padrões Moleculares

A análise dos géis resultantes das técnicas moleculares supracitadas foi realizada utilizando o software Gel-Pro Analyzer 4.0, que gera, por comparação com o padrão de peso molecular, tabelas com os pesos dos fragmentos em análise. As tabelas foram exportadas para o software Microsoft Office Excel 2003, compiladas e organizadas, gerando uma planilha codificada para a presença ou ausência de bandas através da numeração 1 e 0, respectivamente.

A análise da similaridade entre os perfis encontrados foi realizada utilizando-se o programa NTSYS 2.02. O coeficiente escolhido foi o de DICE e o método de agrupamento foi o UPGMA (média das distâncias – *average linkage clustering*). Os dendrogramas foram gerados utilizando o mesmo programa.

A interpretação dos padrões de banda gerados pela técnica de RAPD seguiu os critérios de Speijer 1999, considerando como ponto de corte 80% de homologia entre os isolados para pertencerem ao mesmo grupo.

A interpretação dos fragmentos originados pela restrição com SpeI e separados por PFGE seguiu os critérios propostos por Tenover e colaboradores em 1995, segundo os quais isolados que apresentaram diferença de até 3 fragmentos foram classificados como altamente relacionados, enquanto que isolados que apresentaram diferença de 4 a 6 fragmentos foram classificados como possivelmente relacionados, e isolados que apresentaram diferenças acima de 7 fragmentos receberam a classificação de não relacionados (TENOVER *et al.*, 1995)

## 3.4 PESQUISA DE METALO-B-LACTAMASE

### 3.4.1 Triagem Fenotípica Para Metallo- $\beta$ -Lactamase (M $\beta$ L)

Todas as amostras com resistência plena (MIC  $\geq$  16 $\mu$ g/ml) ou intermediária (MIC = 8 $\mu$ g/ml) aos carbapenêmicos foram submetidas aos testes de triagem para detecção de M $\beta$ L.

A triagem para determinar a presença de M $\beta$ Ls utilizou as metodologias de dupla difusão em ágar, disco combinado e fitas de E-test® (AB Biodisk).

Foram utilizadas placas de Petri descartáveis de 150 x 15 mm contendo uma camada de 3 a 4 mm de ágar Müller-Hinton, preparadas seguindo as instruções do fabricante.

Os inóculos bacterianos foram preparados por suspensão direta, em soro fisiológico (NaCl 0,9%), a partir de colônias isoladas em placa de ágar não seletivo com 18 a 24 horas de crescimento. A turvação da suspensão foi ajustada para a escala 0,5 de McFarland, que contém aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, utilizando-se um densitômetro Densimat (Biomérieux) com comprimento de onda de 625 nm.

#### 3.4.1.1 Teste da Dupla Difusão em Ágar

O sinergismo entre discos foi testado utilizando-se ácido 2-mercaptopropiônico (MPA) como inibidor de M $\beta$ L frente aos substratos ceftazidima (30  $\mu$ g) e imipenem (10  $\mu$ g). Um disco sem antimicrobiano foi posicionado entre os substratos a uma distância de 20 mm do disco de ceftazidima e 10 mm do disco de imipenem, de centro a centro, utilizando-se um molde sob a placa de Müller-Hinton. Em seguida, 3  $\mu$ l de solução não diluída de MPA foram adicionados sobre o disco branco, e após 5 min. a placa foi invertida e incubada a  $35^\circ \pm 1^\circ \text{C}$  por 18 a 24 horas.

A dupla difusão em ágar foi utilizada também para verificar o sinergismo entre outro inibidor de M $\beta$ L, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (0,5 M), frente ao imipenem. O disco branco foi posicionado a uma distância de 10 mm do disco de imipenem, centro a centro, e na seqüência 5  $\mu$ l de EDTA 0,1 mM foram adicionados a este disco. Após 5 min. a placa foi invertida e incubada a  $35^\circ \pm 1^\circ \text{C}$  por 18 a 24 horas.

O critério de interpretação foi a observação do aumento da zona de inibição de crescimento bacteriano causada pelos antimicrobianos ceftazidima e/ou imipenem nos discos próximos ao inibidor enzimático comparados com discos controles inseridos na mesma placa e posicionados afastados dos discos com inibidor enzimático, e/ou a formação de zona fantasma, ou seja, um halo sem crescimento bacteriano entre o disco do antimicrobiano e o disco do inibidor enzimático.

#### 3.4.1.2 Teste do Disco Combinado

A combinação entre o substrato e o inibidor de M $\beta$ L em um mesmo disco foi testada utilizando-se discos de meropenem (10  $\mu$ g) e imipenem (10  $\mu$ g), aos quais foram adicionados 5  $\mu$ l de EDTA 0,1 mM. As placas foram incubadas a 35°  $\pm$  1 °C por 18 a 24 horas.

Os halos de inibição foram medidos e comparados aos halos gerados por discos controles de meropenem e imipenem sem o inibidor, inseridos na mesma placa.

#### 3.4.1.3 Fita de E-test®

As fitas de E-test® para detecção de M $\beta$ L, que contêm em uma extremidade imipenem (IP) e na outra imipenem+EDTA (IPI), foram utilizadas conforme orientação do fabricante.

O procedimento utilizado para interpretação foi o seguinte: uma redução maior ou igual a 3 diluições, isto é, razão entre CIM obtida com imipenem e CIM obtida com imipenem+EDTA maior ou igual a 8 foi considerada indicativa da produção de M $\beta$ L pela cepa testada, assim como a formação de zonas fantasmas entre os dois gradientes formados (critérios recomendados pelo fabricante).

#### 3.4.2 PCR para Detecção dos Genes de Metallo- $\beta$ -Lactamase

A confirmação das M $\beta$ L como mecanismo de resistência aos carbapenêmicos foi feita através da pesquisa dos genes (*bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub>) codificadores dessas enzimas por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os *primers* utilizados foram baseados nas regiões conservadas de cada gene, seguindo-se a seqüência consenso (Quadro 2) determinada por Sader e colaboradores (2005).

<b>PRIMERS</b>	<b>SEQÜÊNCIA</b>
<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	5' CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC 3' 5' GAACAACCAGTTTTGCCTTACC 3'
<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	5' TCTACATGACCGCGTCTGTC 3' 5' TGTGCTTTGACAACGTTTCGC 3'
<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	5' ATGTTCAAACCTTTTGAGTAGTAAG 3' 5' CTACTIONAACGACTGAGCG 3'
<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	5' CCTACAATCTAACGGCGACC 3' 5' TCGCCGTGTCCAGGTATAAC 3'

QUADRO 2 – SEQÜÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA PCR PARA PESQUISA DE GENES CODIFICADORES DE M $\beta$ L EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P.aeruginosa*.

#### 3.4.2.1 Extração do DNA

Os isolados bacterianos selecionados, armazenados a -80°C foram cultivados em ágar não seletivo, em estufa a 35°  $\pm$  1 °C por 18 a 24 horas. Em tubo tipo Eppendorff, com 500  $\mu$ l de solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril, foi preparada uma suspensão bacteriana densa utilizando-se 4 a 5 colônias bem isoladas. A suspensão foi agitada em agitador do tipo vortex e os tubos colocados em placa térmica a 100°C por 15 min. Para promover a lise da célula bacteriana ; após este período, os tubos foram centrifugados por 10 min a 5.000 rpm. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro tubo e acondicionado em temperatura de 2° a 8°C até o momento do uso.

#### 3.4.2.2 Amplificação

As reações de PCR tiveram um volume final de 25  $\mu$ l, contendo tampão de enzima 10X (10  $\mu$ M), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) 10 mM (0,625  $\mu$ l de cada), *primers* 50 ng/ $\mu$ l de cada (1  $\mu$ l), água (20,75  $\mu$ l), Taq-DNA-polimerase (1 U  $\mu$ l) e 2,0  $\mu$ l de DNA molde.



Foram utilizadas as mesmas condições de amplificação para os *primers* SPM, VIM-1 e VIM-2, segundo Toleman e colaboradores (2002), desnaturação a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 40° C 1 por min, 68°C por 1 min, e extensão final 68°C por 5 min.

A amplificação para o par de *primers* IMP seguiu o protocolo descrito por Gales e colaboradores em 2002, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 61 °C por 1 min, 72 °C por 1 min.

Os produtos das reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, corados pelo brometo de etídio a 0,5µg/ml e fotografados utilizando transiluminador UV.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE *P. aeruginosa*

Foram analisados 78 isolados de *P. aeruginosa* com sensibilidade variada aos carbapenêmicos. Inicialmente apenas amostras resistentes (MIC  $\geq 16\mu\text{g/ml}$ ) e intermediárias (MIC  $8\mu\text{g/ml}$ ) foram selecionadas, totalizando 50 isolados, sendo que 5 destes foram recuperados de 2 pacientes (3 amostras de um paciente e 2 de outro paciente) com um intervalo médio de 30 dias entre as coletas. Em um segundo momento, 28 isolados de *P. aeruginosa* sensíveis aos carbapenêmicos, coletados aleatoriamente, foram incluídos na pesquisa.

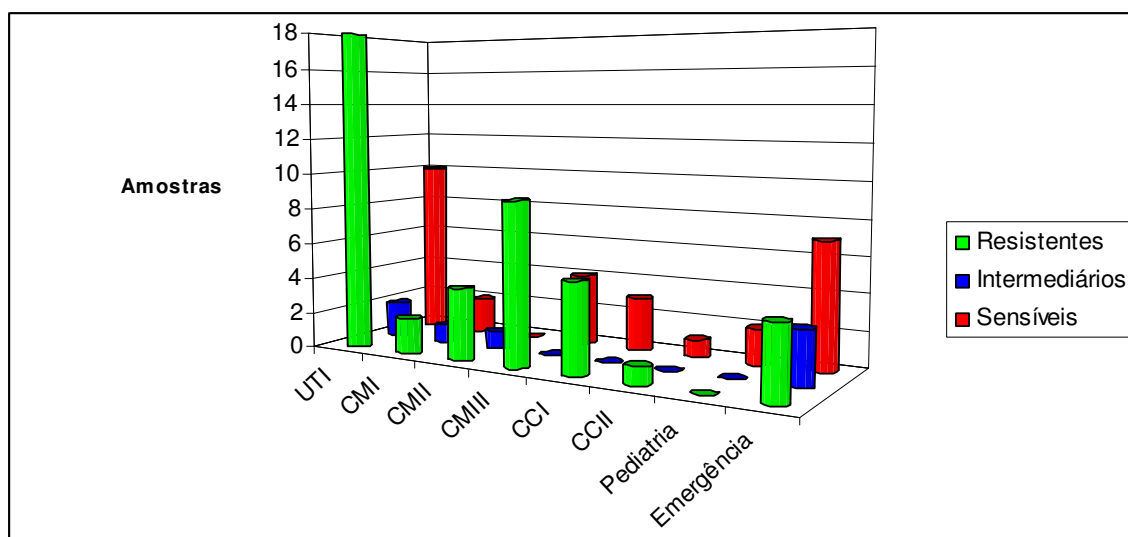
**TABELA 2** – DISTRIBUIÇÃO DOS 78 ISOLADOS DE *P. aeruginosa* NAS UNIDADES DE INTERNAÇÃO DO HOSPITAL SEGUNDO O PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS CARBAPENÊMICOS

UNIDADES DE INTERNAÇÃO	PERFIL DE SENSIBILIDADE		
	Resistentes	Intermediários	Sensíveis
UTI	18 (41.9%)	2 (28.6%)	10 (35.7%)
CMI	2 (4.7%)	1 (14.3%)	2 (7.1%)
CMII	4 (9.3%)	1 (14.3%)	-
CMIII	9 (20.9%)	-	4 (14.3%)
CCI	5 (11.6%)	-	3 (10.7%)
CCII	1 (2.3%)	-	1 (3.6%)
Pediatria	-	-	1 (3.6%)
Emergência	4 (9.3%)	2 (28.6%)	7 (25.0%)
Total de amostras	43	7	28

NOTA: UTI – Unidade de Terapia Intensiva; CMI – Clínica Médica I; CMII – Clínica Médica II; CMIII – Clínica Médica III; CCI – Clínica Cirúrgica I; CCII – Clínica Cirúrgica II

As amostras foram provenientes de pacientes hospitalizados nas diversas unidades de internação do hospital (Tabela 2). No Gráfico-1, observa-se em verde a disseminação dos isolados resistentes aos carbapenêmicos na maioria das clínicas, com exceção da pediatria, pois não foram isoladas amostras resistentes nesta unidade. A maior parte dos isolados resistentes foi proveniente da UTI (41,9%) e CMIII (20,9%).

As amostras foram isoladas de variados sítios anatômicos (Tabela 3). A maior ocorrência de isolados resistentes aos carbapenêmicos foi proveniente do trato urinário, seguido da corrente sanguínea, representada por hemocultura e cultura de ponta de cateter e trato respiratório, representado por aspirado traqueal e líquido pleural.



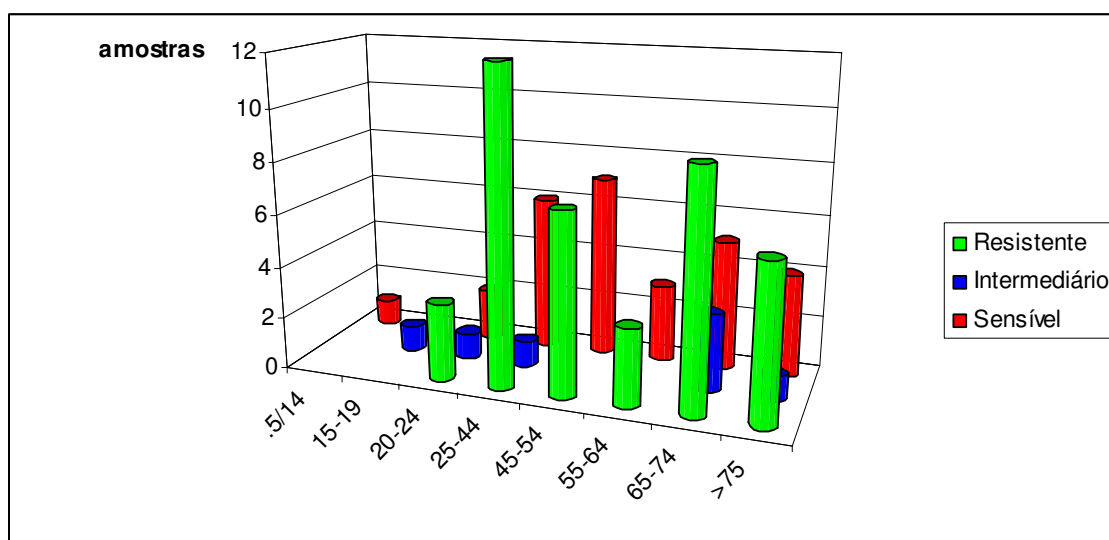
**GRÁFICO 1** – DISTRIBUIÇÃO DOS 78 ISOLADOS DE *P. aeruginosa* NAS UNIDADES DE INTERNAÇÃO DO HU/UFSC, SEGUNDO A SENSIBILIDADE AOS CARBAPENÊMICOS.

NOTA: UTI – Unidade de Terapia Intensiva; CMI – Clínica Médica I; CMII – Clínica Médica II; CMIII – Clínica Médica III; CCI – Clínica Cirúrgica I; CCII – Clínica Cirúrgica II

**TABELA 3** – DISTRIBUIÇÃO DOS 78 ISOLADOS DE *P. aeruginosa* POR SÍTIO ANATÔMICO SEGUNDO A SENSIBILIDADE AOS CARBAPENÊMICOS.

SÍTIOS ANATÔMICOS	PERFIL DE SENSIBILIDADE		
	Resistentes	Intermediários	Sensíveis
Aspirado Traqueal	7 (16.3%)	1 (14.3%)	9 (32.5%)
Cateter	10 (23.3%)	2 (28.6%)	2 (7.1%)
Escarro	-	-	1 (3.5%)
Líquido Pleural	1 (2.3%)	-	-
Líquido Peritoneal	1 (2.3%)	-	-
Prótese	-	-	1 (3.5%)
Sangue	3 (7.0%)	-	1 (3.5%)
Secreção	5 (11.6%)	-	5 (17.8%)
Urina	16 (37.2%)	4 (57.1%)	9 (32.1%)
Total de amostras	43	7	28

A análise dos isolados separados por faixa etária mostrou maior ocorrência de isolados resistentes aos carbapenêmicos no grupo entre 25 e 44 anos de idade (Gráfico 2). A média de idade entre os pacientes com isolados resistentes foi de 54 anos, com idade mínima de 21 e máxima de 85 anos. Para os pacientes com isolados sensíveis aos carbapenêmicos, a média de idade foi de 50 anos (mínima de 12 e máxima de 81 anos).



**GRÁFICO 2** – FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES EM ANOS SEGUNDO A SENSIBILIDADE DAS 78 AMOSTRAS DE *P. aeruginosa* AOS CARBAPENÊMICOS

A transferência das amostras do freezer -80°C do HU/UFSC para o freezer -80°C do HC/UFPR resultou na perda de 14 amostras resistentes e 3 amostras sensíveis aos carbapenêmicos. Assim, 78 amostras foram submetidas às técnicas de RAPD e PCR-RFLP desenvolvidas no laboratório de Biologia Molecular /Laboratório de Análises Clínicas/ HU/UFSC. A segunda parte do projeto, determinação da CIM, pesquisa de M $\beta$ L e PFGE, foi realizada com 61 isolados bacterianos no laboratório de Biologia Molecular da Seção de Bacteriologia / Serviço de Análises Clínicas/ HC/UFPR.

## 4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Após a determinação da CIM pela metodologia da diluição em ágar, os 61 isolados foram segregados segundo a sensibilidade aos carbapenêmicos em resistentes, intermediários e sensíveis.

Para as amostras resistentes aos carbapenêmicos, a Tabela 4 mostra a CIM50, CIM90 e a porcentagem de isolados sensíveis aos antimicrobianos testados. Entre estas amostras, o já restrito arsenal terapêutico anti-pseudomonas ficou limitado à polimixina B (100% sensibilidade) e à piperacilina/tazobactam (96,7% de sensibilidade).

**TABELA 4** – PERFIL DE SENSIBILIDADE, CIM 50 E CIM 90 DOS 29 ISOLADOS DE *P. aeruginosa* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS FRENTE AOS ANTIBIÓTICOS ANTI-PSEUDOMONAS.

ANTIMICROBIANO	CIM 90 (µg/ml)	CIM 50 (µg/ml)	SENSÍVEIS %
Meropenem	128	64	0
Imipenem	32	16	0
Pipe/Tazobactam	16/4	8/4	96.7
Polimixina B	0.25	0.25	100.0
Ciprofloxacino	32	0.12	10
Ceftazidima	16	4	43
Cefepime	16	8	6.6
Aztreonam	32	16	6.6
Gentamicina	>128	4	10
Amicacina	>512	8	16.7

NOTA: CIM 50: concentração do antibiótico em que 50% dos isolados teve seu crescimento inibido. CIM 90: Concentração do antibiótico em que 90% dos isolados teve seu crescimento inibido.

Entre os 29 isolados resistentes aos carbapenêmicos testados para determinação da CIM, observaram-se oito perfis de sensibilidade (Tabela 5).

Entre os sete isolados com sensibilidade intermediária, 6 amostras apresentaram sensibilidade diminuída somente frente ao meropenem, mantendo-se sensíveis ao imipenem; apenas 1 amostra mostrou-se intermediária a ambos. O perfil de sensibilidade às outras classes de antimicrobianos foi variado para estes isolados, mantendo 100% de sensibilidade frente à polimixina B e piperacilina/tazobactam, e 83% de sensibilidade frente à ceftazidima (Tabela 6).

**TABELA 5** – PERFIS DE SENSIBILIDADE OBSERVADOS ENTRE OS 29 ISOLADOS DE *P. aeruginosa* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS TESTADOS PARA DETERMINAÇÃO DA CIM.

ANTIMICROBIANOS	NÚMERO DE AMOSTRAS SENSÍVEIS
Polimixina B	1
Polimixina B+ Pipe/Tazobactam	13
Polimixina B+ Pipe/Tazobactam+Ceftazidima	8
Polimixina B+ Pipe/Tazobactam+ Amicacina	1
Polimixina B+ Pipe/Tazobactam+Ceftazidima +Amicacina	1
Polimixina B+ Pipe/Tazobactam+Ceftazidima +Amicacina+ Gentamicina +Ciprofloxacino	1
Polimixina B+ Pipe/Tazobactam+ Amicacina + Gentamicina +Ciprofloxacino	2
Polimixina B+ Pipe/Tazobactam+ Amicacina + Gentamicina +Ciprofloxacino + Cefepime + Ceftazidima + Aztreonam	2
Total	29

**TABELA 6** – PERFIL DE SENSIBILIDADE, CIM 50 DOS 7 ISOLADOS DE *P. aeruginosa* COM RESISTÊNCIA INTERMEDIÁRIA AOS CARBEPENENS FRENTE AOS ANTIBIÓTICOS ANTI-PSEUDOMONAS.

ANTIMICROBIANO	CIM 50 (µg/ml)	SENSÍVEIS %
Meropenem	8	0
Imipenem	1	83.3
Pipe/Tazobactam	<1/4	100.0
Polimixina	<0.12	100.0
Ciprofloxacino	0.03	16.7
Ceftazidima	0.25	83.3
Cefepime	2	33.3
Aztreonam	0.1	33.3
Gentamicina	1	16.7
Amicacina	2	50.7

NOTA: CIM 50: concentração do antibiótico em que 50% dos isolados teve seu crescimento inibido.

Os 25 isolados sensíveis aos carbapenêmicos que foram testados para determinação da CIM, apresentaram boa sensibilidade aos outros antimicrobianos testados. A droga que apresentou menor sensibilidade foi o aztreonam (57.7% de sensibilidade), seguido pelos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas com 73% de sensibilidade (Tabela 7).

**TABELA 7** – PERFIL DE SENSIBILIDADE, CIM 50 E CIM 90 DOS 25 ISOLADOS DE *P. aeruginosa* SENSÍVEIS AOS CARBAPENÊMICOS FRENTE AOS ANTIBIÓTICOS ANTI-PSEUDOMONAS

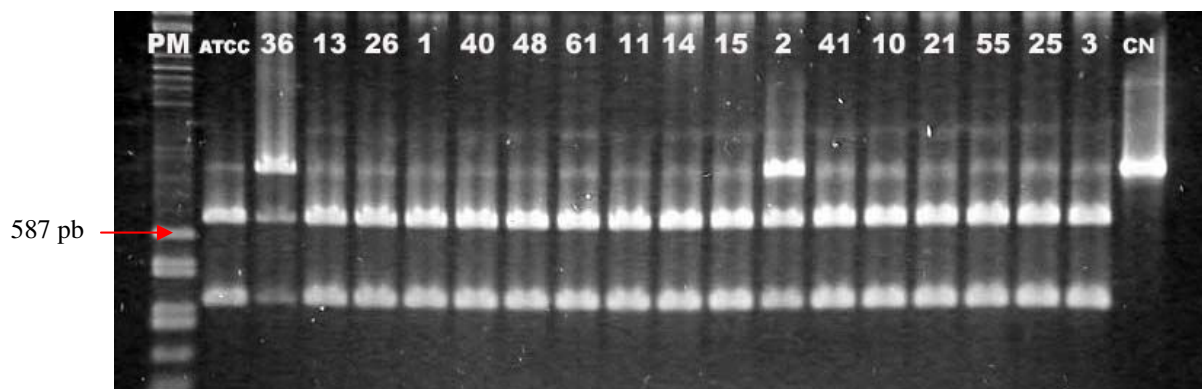
ANTIMICROBIANO	CIM 90 (µg/ml)	CIM 50 (µg/ml)	SENSÍVEIS %
Meropenem	1	0.5	100.0
Imipenem	2	1	100.0
Pipe/Tazobactam	<1/4	<1/4	100.0
Polimixina	0.25	<0.12	100.0
Ciprofloxacino	0.25	0.12	73.0
Ceftazidima	2	1	84.6
Cefepime	4	2	76.9
Aztreonam	4	2	57.7
Gentamicina	2	1	73.0
Amicacina	4	2	73.0

NOTA: CIM 50: concentração do antibiótico em que 50% dos isolados teve seu crescimento inibido. CIM 90: Concentração do antibiótico em que 90% dos isolados teve seu crescimento inibido.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *P. aeruginosa*

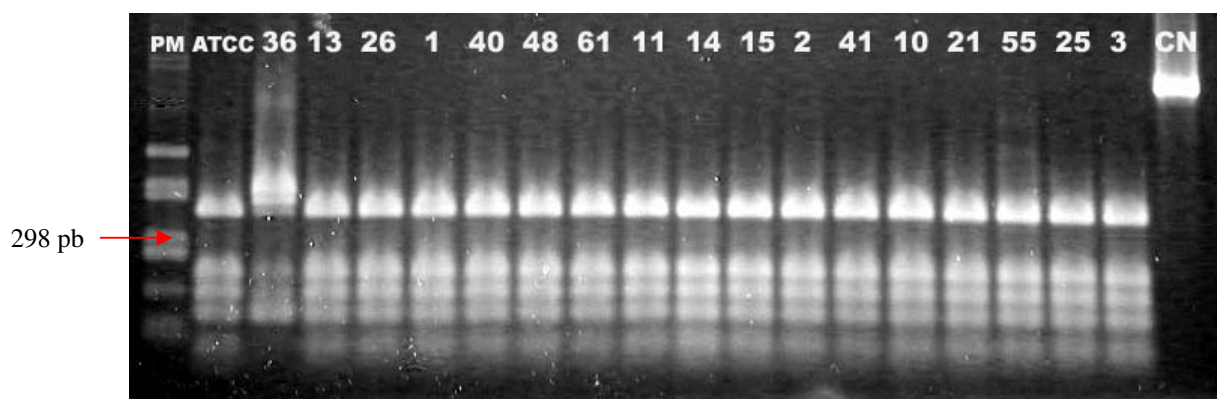
##### 4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição (PCR-RFLP)

As Figuras 4 e 5 mostram os perfis resultantes da restrição dos produtos de PCR (*primers* 515F/1492R) com as enzimas *Bam*HI e *Hae*III, respectivamente. Foram observados 3 perfis de restrição utilizando-se a enzima *Hae*III (figura 5). Das 78 amostras de *P. aeruginosa* analisadas, 73 (93.6%) apresentaram o mesmo perfil da cepa referência ATCC 25823 (perfil A); o perfil B foi observado nas amostras 38, 43 e 57; e o perfil C foi observado nas amostras 67 e 68. Com a enzima *Bam*HI não houve clivagem por ausência de sítio de restrição nas amostras 38, 43, 57, 67 e 68, correspondente ao perfil B e C da *Hae*III.



**FIGURA 4** – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1% DOS PRODUTOS DA PCR AMPLIFICADOS COM OS *PRIMERS* 515F/1492R CLIVADOS COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Bam*HI DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa*

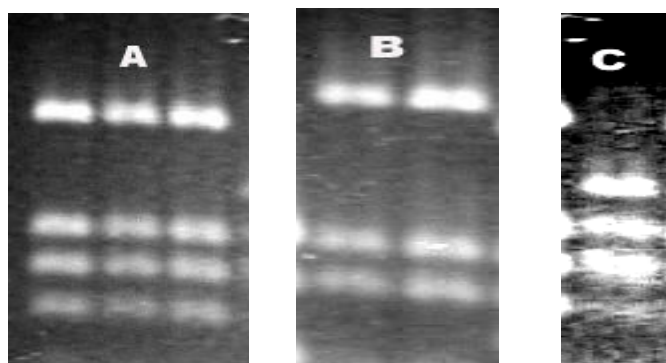
NOTA: PM – marcador de peso molecular (HMW e LMW *in house*); ATCC – *P.aeruginosa* ATCC 25823; Os números 36 a 3 correspondem as amostras clínicas de *P. aeruginosa*. CN – *P. aeruginosa* ATCC 25823 não submetida à restrição.



**FIGURA 5** – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1% DOS PRODUTOS DA PCR AMPLIFICADOS COM OS *PRIMERS* 515F/1492R CLIVADOS COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Hae*III DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *P.aeruginosa*

NOTA: PM – marcador de peso molecular (LMW *in house*); ATCC – *P.aeruginosa* ATCC 25823; Os números 36 a 3 correspondem as amostras clínicas de *P. aeruginosa*. CN – *P. aeruginosa* ATCC 25823 não submetida à restrição.





**FIGURA 6** – POLIMORFISMO NOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO OBSERVADOS UTILIZANDO A ENZIMA *Hae*III NOS PRODUTOS DA PCR (*PRIMERS* 515F/1492R) EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* (HU/UFSC)

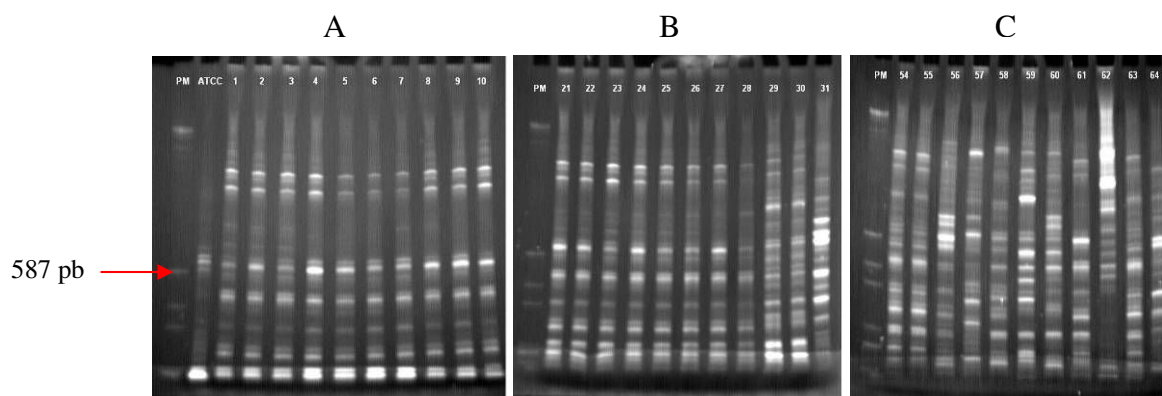
NOTA: A - perfil A, B - perfil B, C- perfil C.

#### 4.3.2 Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD)

As amostras foram aplicadas nos géis de eletroforese conforme o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos: nos primeiros géis as amostras resistentes aos carbapenêmicos e nos últimos as sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

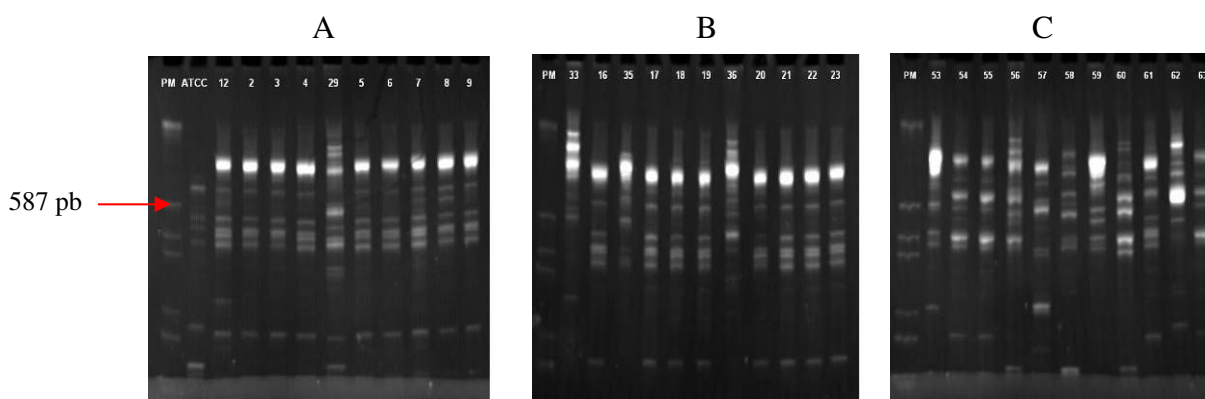
A análise visual dos primeiros géis resultantes da amplificação com os *primers* 208 (Figura 7A e 7B) e M13 (Figuras 8A e 8B), mostra um padrão de bandas bem semelhantes, indicando possível clonalidade entre as amostras resistentes aos carbapenêmicos, confirmada pela análise no programa NTSYS (Figura 11 e 12). As amostras sensíveis aos carbapenêmicos apresentaram na análise no programa NTSYS perfis policlonais compatíveis com o observado nas figuras 7C e 8C.

Os géis com os produtos das reações que utilizaram os *primers* 272 e 3303 apresentaram muitos fragmentos de fraca intensidade, dificultando suas análises (Figuras 9 e 10, respectivamente). Apesar disso, foi possível observar uma maior semelhança entre o padrão gerado para as amostras resistentes aos carbapenêmicos (Figuras 9A, 9B, 10A e 10B).



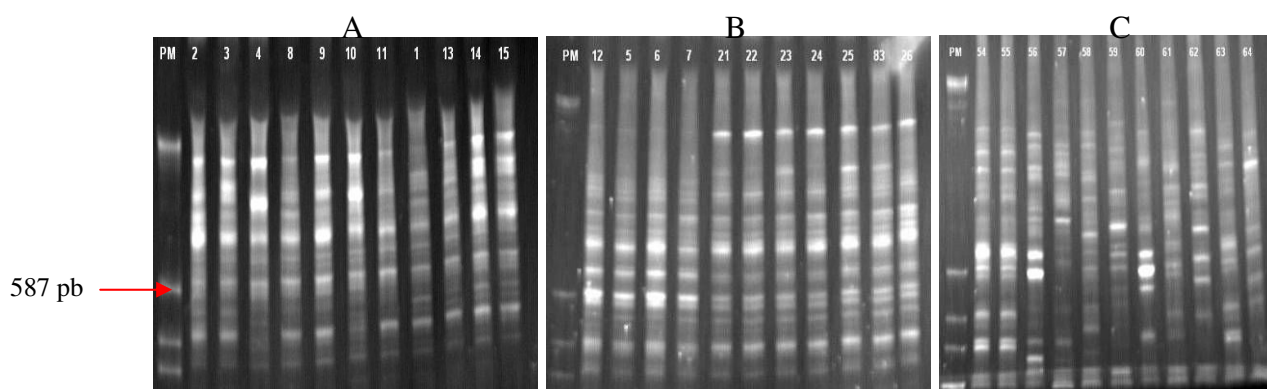
**FIGURA 7** - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (4%) DO PRODUTO DA REAÇÃO DE RAPD UTILIZANDO O *PRIMER* 208 EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* (HU/UFSC)

NOTA: A - gel 1: amostras resistentes aos carbapenêmicos; B - gel 3: amostras resistentes aos carbapenêmicos; C - gel 6: amostras sensíveis aos carbapenêmicos. PM – marcador de peso molecular (HMW e LMW *in house*); ATCC – *P. aeruginosa* ATCC 25823.



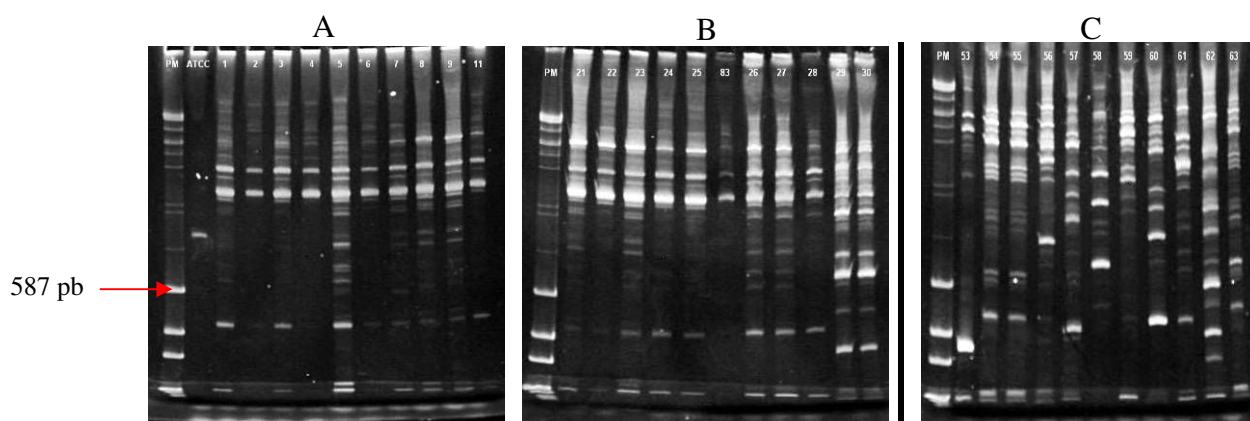
**FIGURA 8** - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (4%) DO PRODUTO DA REAÇÃO DE RAPD UTILIZANDO O *PRIMER* M13 EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* (HU/UFSC)

NOTA: A - gel 1: amostras resistentes aos carbapenêmicos; B - gel 3: amostras resistentes aos carbapenêmicos; C - gel 6: amostras sensíveis aos carbapenêmicos. PM – marcador de peso molecular (HMW e LMW *in house*); ATCC – *P. aeruginosa* ATCC 25823.



**FIGURA 9** - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (4%) DO PRODUTO DA REAÇÃO DE RAPD UTILIZANDO O *PRIMER* 272 EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* (HU/UFSC)

NOTA: A - gel 1: amostras resistentes aos carbapenêmicos; B - gel 3: amostras resistentes aos carbapenêmicos; C - gel 6: amostras sensíveis aos carbapenêmicos. PM – marcador de peso molecular (HMW e LMW *in house*); ATCC – *P. aeruginosa* ATCC 25823.



**FIGURA 10** - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (4%) DO PRODUTO DA REAÇÃO DE RAPD UTILIZANDO O *PRIMER* 3303 EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* (HU/UFSC)

NOTA: A - gel 1: amostras resistentes aos carbapenêmicos; B - gel 3: amostras resistentes aos carbapenêmicos; C - gel 6: amostras sensíveis aos carbapenêmicos. PM – marcador de peso molecular (HMW e LMW *in house*); ATCC – *P. aeruginosa* ATCC 25823.

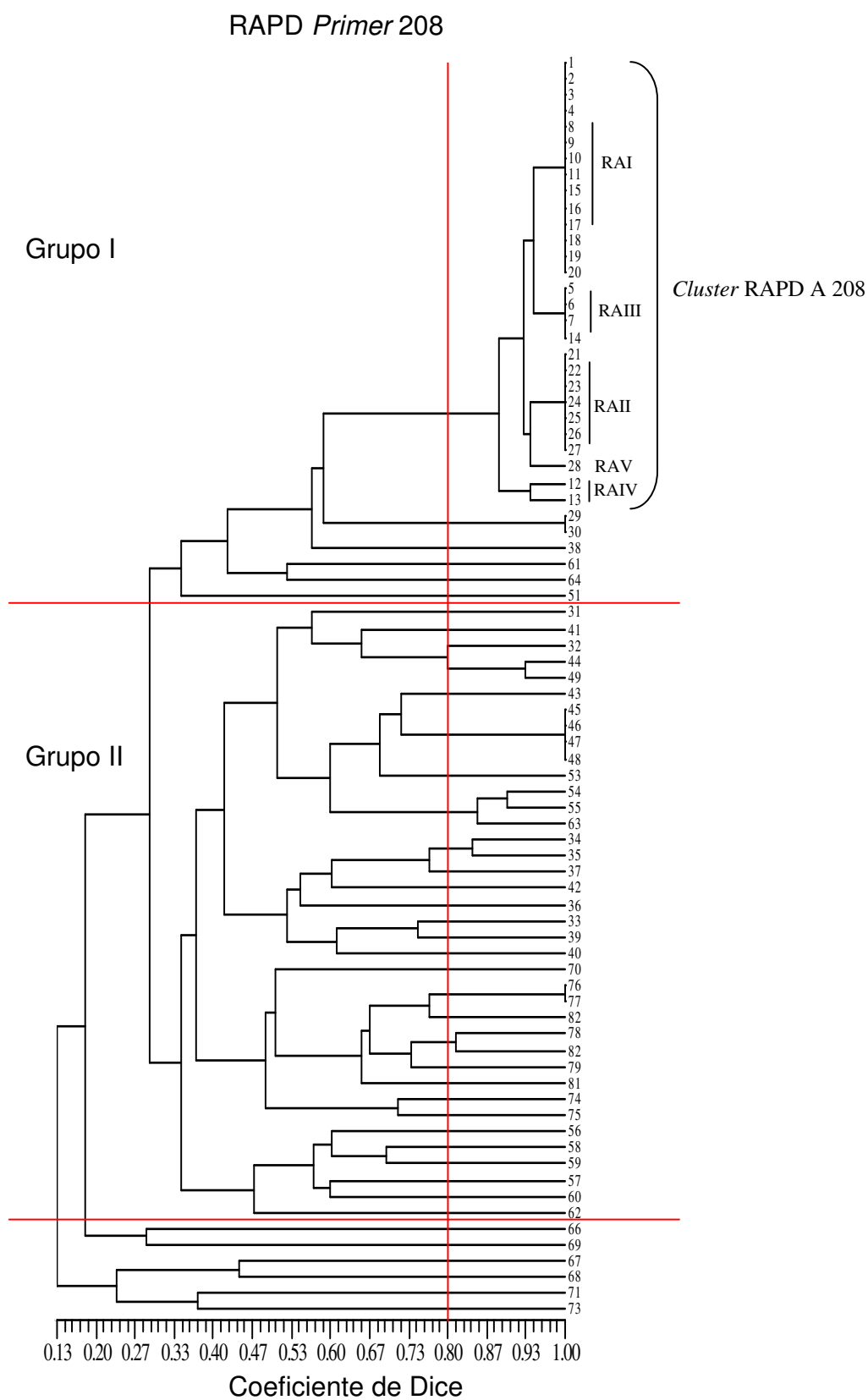
O dendrograma de similaridade baseado no polimorfismo dos fragmentos amplificados pela técnica de RAPD utilizando os primers 208 (Figura 11), agrupou a maior parte dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos em um *cluster* com mais de 80% de similaridade (*cluster* RAPD A 208). A análise deste dendrograma permitiu verificar a formação de dois grupos principais. O Grupo I, no qual está inserido o *cluster* RAPD A, agrupou 34 isolados, dos quais 32 eram resistentes aos carbapenêmicos. Dentro deste *cluster* foi possível distinguir quatro subgrupos com similaridade maior que 90% (RAI, RAII, RAIII e RAV). O grupo II

reuniu 44 amostras que apresentaram baixa similaridade umas com as outras, entre elas apenas 10 eram resistentes aos carbapenêmicos.

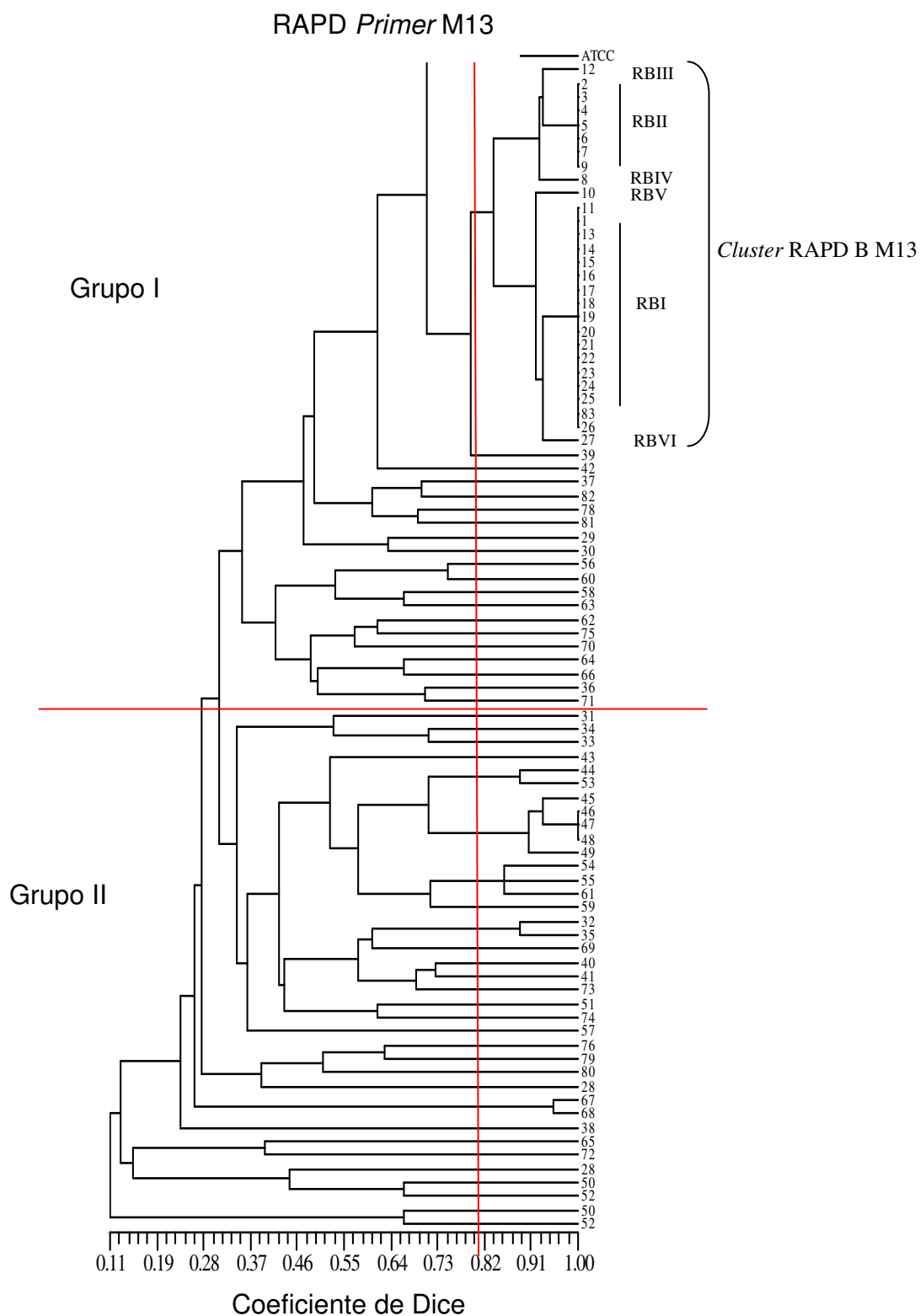
No dendrograma construído a partir dos dados da reação de RAPD utilizando o primer M13 (Figura 12), foi possível distinguir dois grupamentos principais, o Grupo I incluiu 44 amostras, nele observou-se a formação de um *cluster* entre os isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, com similaridade superior a 80% (*cluster* RAPD B M13). Dentro deste agrupamento foi possível distinguir dois grupos menores com similaridade próxima a 90%, um é formado pelo subgrupo RBI e pelas amostras isoladas classificadas como subgrupo RBV e RBVI, e o outro pelo subgrupo RBII e pelas amostras classificadas como subgrupo RBIII e RBIV.

Utilizando-se os critérios de Speijer (1999), as amostras clonais com base no polimorfismo de fragmentos amplificados pelo *primer* 208, também foram agrupadas na amplificação pelo *primer* M13, com exceção da amostra 28 agrupada somente no *cluster* RAPD A 208 e da amostra 83 agrupada somente no *cluster* RAPD B M13.

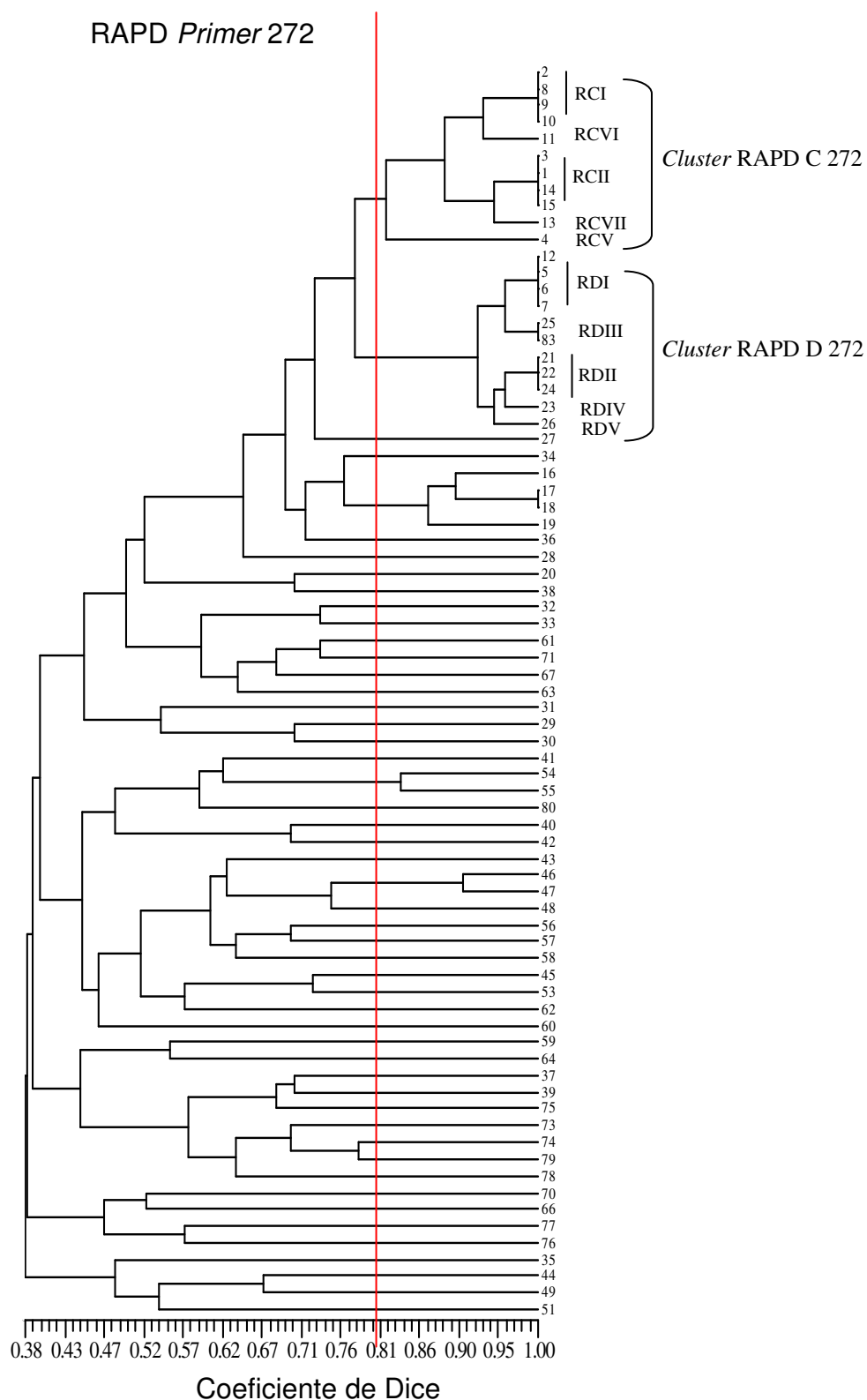
A análise dos dendrogramas construídos com base no polimorfismo resultante das reações com os *primers* 272 e 3303 (Figura 13 e 14) mostrou baixa similaridade entre a maioria dos isolados. Considerando-se o coeficiente de similaridade de 80%, as amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, classificadas como clonais pelos *primers* 208 e M13, formaram dois *clusters* quando amplificadas com o *primer* 272 (RAPD C 272 e RAPD D 272) (Figura 13). Estas mesmas amostras foram agrupadas em sete *clusters* utilizando o *primer* 3303 (Figura 14).



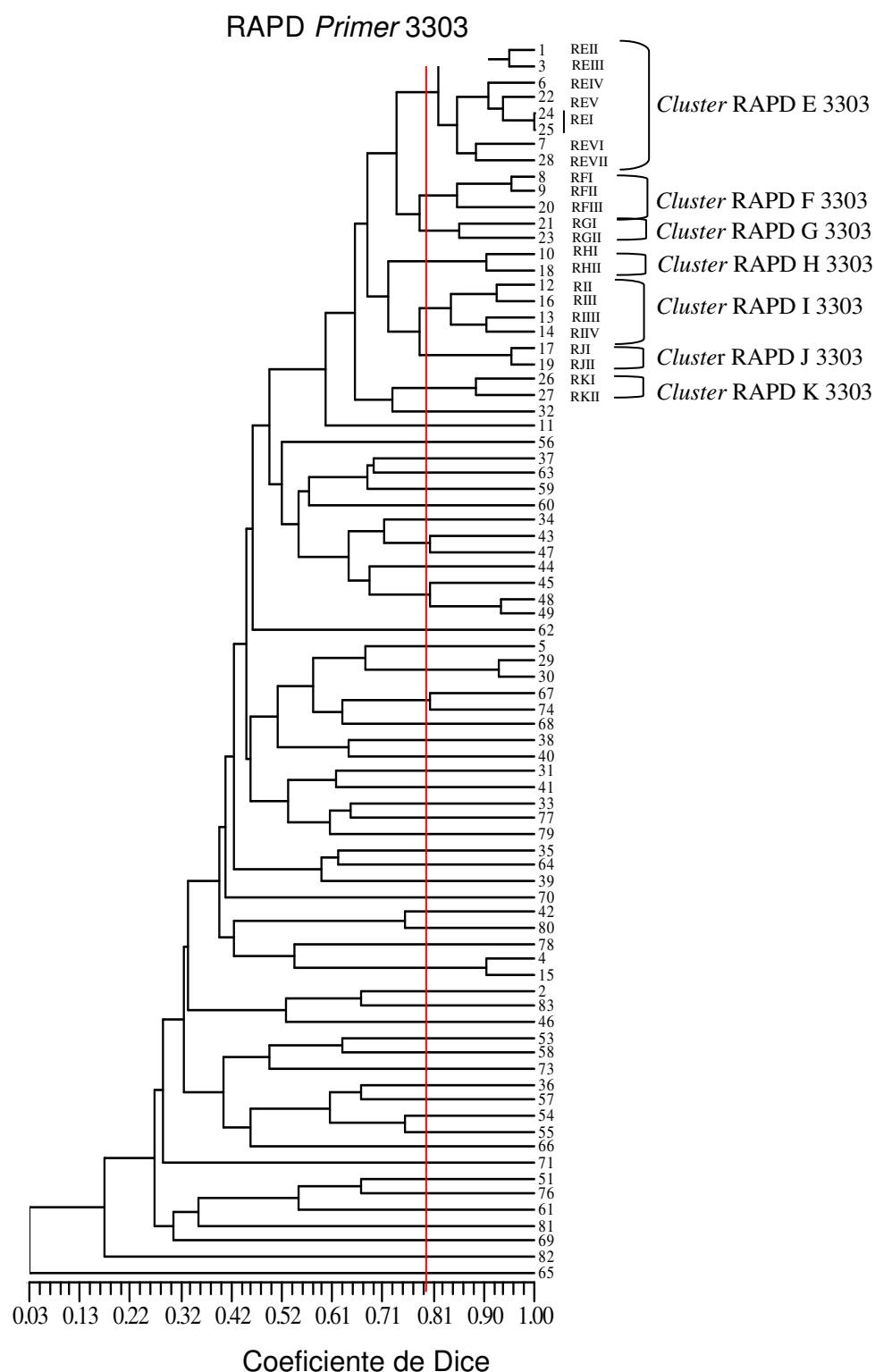
**FIGURA 11** – DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE CONFECCIONADO COM BASE NOS RESULTADOS DA REAÇÃO DE RAPD UTILIZANDO O *PRIMER 208* EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* (HU/UFSC)



**FIGURA 12** - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE CONFECCIONADO COM BASE NOS RESULTADOS DA REAÇÃO DE RAPD UTILIZANDO O *PRIMER* M13 EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* (HU/UFSC)



**FIGURA 13** DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE CONFECCIONADO COM BASE NOS RESULTADOS DA REAÇÃO DE RAPD UTILIZANDO O *PRIMER 272* EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* (HU/UFSC)

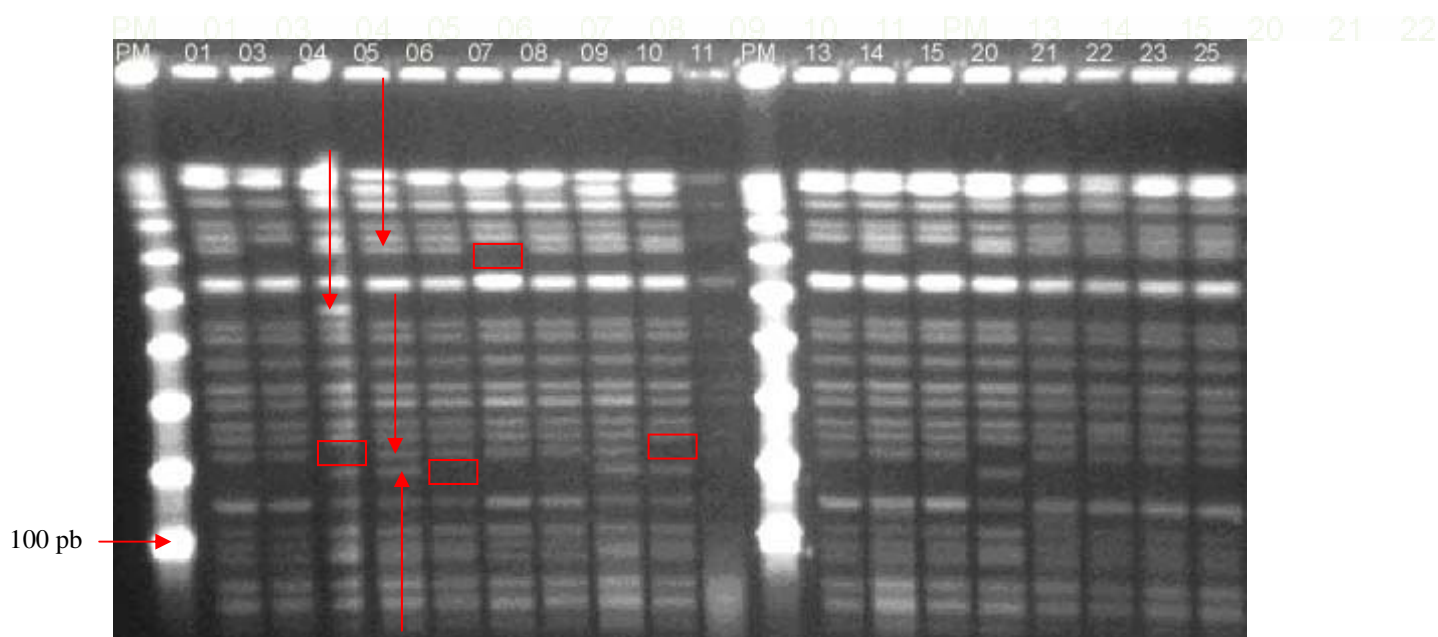


**FIGURA 14** - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE CONFECCIONADO COM BASE NOS RESULTADOS DA REAÇÃO DE RAPD UTILIZANDO O *PRIMER* 3303 EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* (HU/UFSC)



#### 4.3.3 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A figura 15 mostra um gel de eletroforese em campo pulsado de amostras resistentes aos carbapenêmicos, ilustrando a presença de um clone quando aplicados os critérios de Tenover (1995). Cronologicamente, o isolado 05 foi o mais antigo entre as amostras clonais tipificadas por PFGE, e apenas o isolado 09 foi idêntico a este. Os isolados 01, 06, 08, 14, 21, 22, 23 e 25 eram idênticos entre si e diferiram em apenas um fragmento dos isolados 05 e 09. Os isolados 03, 07, 13 e 15 eram idênticos e diferiram do isolado 05 por um fragmento diferente do grupo anterior. Do mesmo modo, os isolados 10 e 20 eram idênticos, mas diferiram em uma banda do isolado 04, que por sua vez diferiu em duas bandas do isolado 05. Segundo Tenover (1995), esses isolados devem ser considerados altamente relacionados por diferirem entre si em no máximo três bandas, e provavelmente estes subtipos se originaram de um único evento genético.

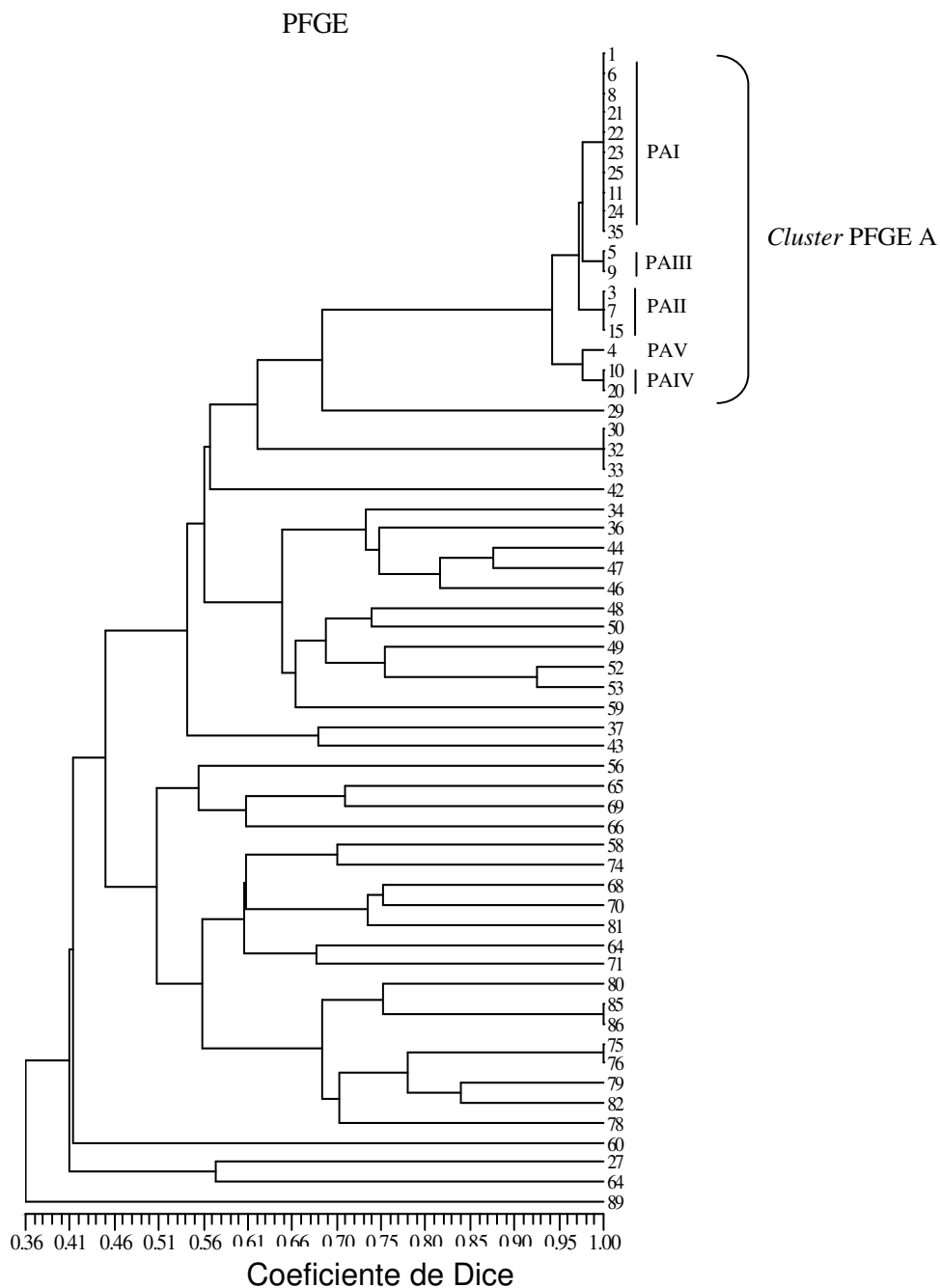


**FIGURA 15** – GEL DE ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE) DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *P.aeruginosa* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO COM A ENZIMA *SpeI*

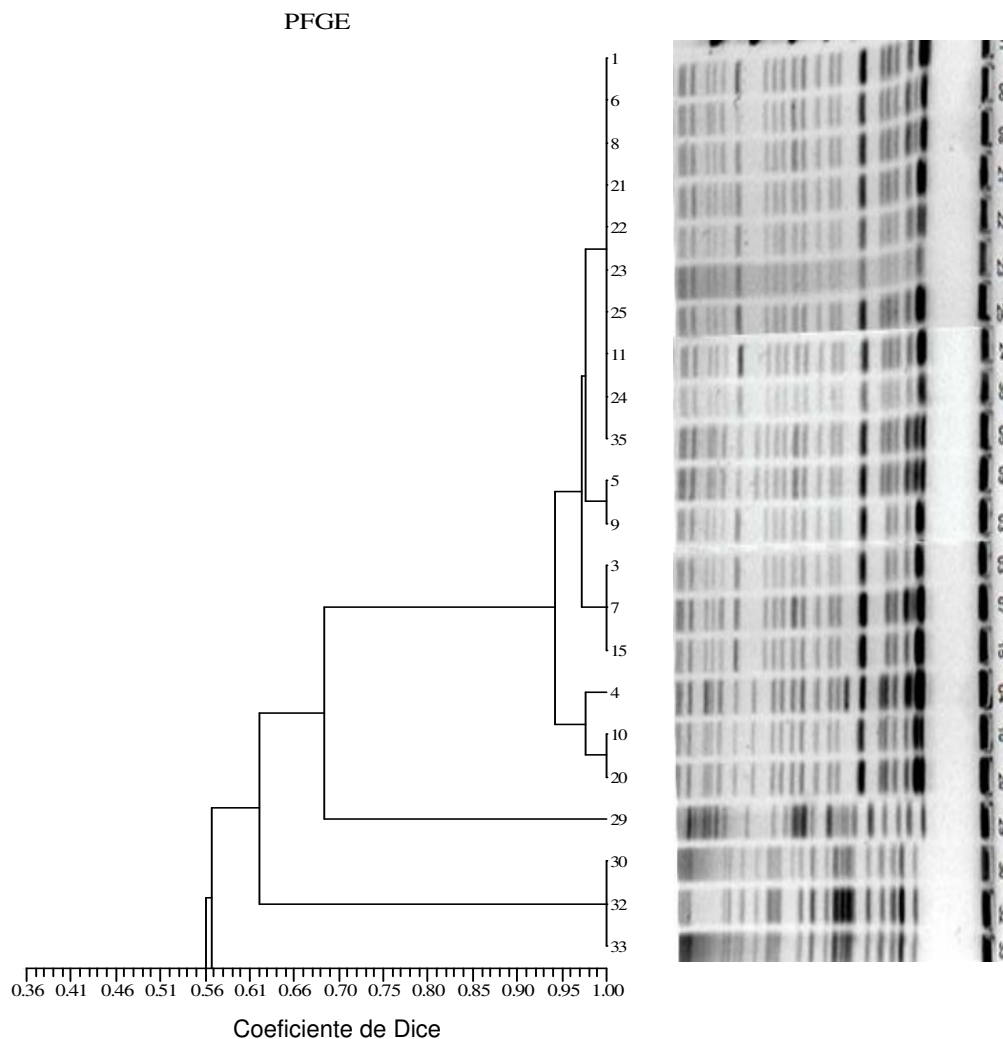
NOTA: PM – marcador de peso molecular. Setas vermelhas indicam os fragmentos diferentes entre os isolados

Analisando os géis de PFGE de todas as amostras pelos programas Gel Pro-Analyser/NTSYS, construiu-se um dendrograma de similaridade baseado no polimorfismo dos fragmentos de restrição (Figura 16). O dendrograma permitiu

verificar a similaridade entre a maioria dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos (*cluster* PFGE A), bem como a variabilidade genética entre os isolados sensíveis a esta classe de antimicrobianos.



**FIGURA 16** - DENDROGRAMA CONFECCIONADO COM BASE NO POLIMORFISMO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO EM PFGE UTILIZANDO A ENZIMA *SpeI* DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa*

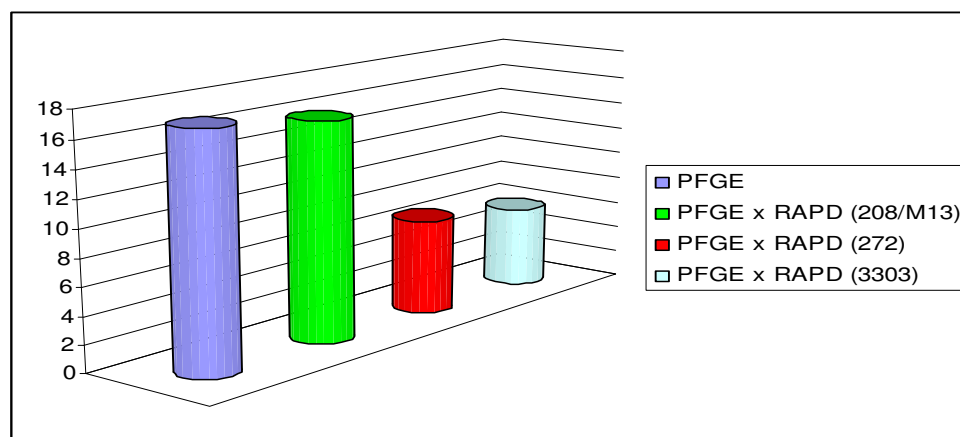


**FIGURA 17 - DENDROGRAMA E PERFIS ELETROFORÉTICOS DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO EM PFGE UTILIZANDO A ENZIMA *SpeI* DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS**

Avaliando somente os isolados resistentes aos carbapenêmicos através do dendrograma de similaridade e do perfil eletroforético (Figura 17), confirma-se a disseminação clonal (*Cluster* PFGE A) entre a maioria destes isolados.

A compilação dos dados gerados pelas duas metodologias, permitiu avaliar a técnica e os *primers* utilizados no RAPD, considerando PFGE como padrão ouro. Analisando apenas um isolado por paciente, entre as 40 amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos genotipadas por RAPD e/ou PFGE, 26 (65%) foram classificadas como clonais por pelo menos uma das metodologias. No total, 27 isolados foram avaliados pelas duas metodologias, 14 apenas pela técnica de RAPD com os variados *primers* e dois apenas por PFGE.

Considerando-se a análise de similaridade dos fragmentos resultantes da amplificação com os *primers* 208 e M13, bem como, a restrição com a endonuclease *SpeI*, 26 isolados foram classificados como pertencentes ao mesmo clone em pelo menos uma das metodologias. Para as amostras avaliadas por PFGE, 17 foram classificadas como clonais (*cluster* PA), apresentando 94% de correlação com o RAPD utilizando os *primers* 208 e M13 (16 amostras), 41% com o RAPD utilizando o *primer* 272 (7 amostras) e 35% de correlação do PFGE e do RAPD utilizando com o *primer* 3303 (6 amostras) (Gráfico 3). Entre as 14 amostras avaliadas apenas pelo RAPD, nove foram classificadas como clonais por pelo menos um *primer* (sete - *primers* 208 e m13; uma – 208; uma - M13; e uma - 208, M13 e 272).



**GRÁFICO 3** – CORRELAÇÃO DAS AMOSTRAS DE *P. aeruginosa* CLASSIFICADAS COMO CLONAIIS PELA TÉCNICA DE PFGE VERSUS RAPD COM DIFERENTES *PRIMERS* (208, M13, 272 E 3303)

#### 4.4 PESQUISA DE METALO-B-LACTAMASES

##### 4.4.1 Métodos Fenotípicos

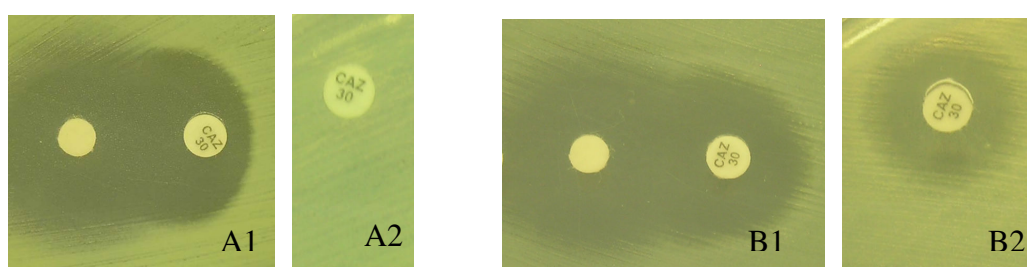
A pesquisa de M $\beta$ L por metodologia fenotípica foi realizada em 33 isolados de *P. aeruginosa*, 26 resistentes aos carbapenêmicos (uma amostra por paciente) e 6 amostras com resistência intermediária.

Analisando os resultados dos testes de disco combinado utilizando EDTA como inibidor e imipenem como substrato, as amostras 05, 06, 07, 08, 09, 11 e 29

foram classificadas como positivas segundo os critérios de Yong, 2002, por apresentarem aumento no halo de inibição variando de 8 a 11 mm. Entre as amostras negativas observou-se aumento de halo entre 5 mm (3 amostras) e 6 mm (4 amostras).

Utilizando-se como substrato o meropenem, as amostras 04, 06, 07 e 08 foram positivas com aumento de 7 e 8 mm no tamanho do halo de inibição. Entre as amostras classificadas como negativas, observou-se aumento de 6 mm (3 amostras) e 5 mm (1 amostra) no tamanho do halo. Os controles IMP e SPM apresentaram aumento variando entre 7 e 13 mm para ambos os substratos.

O teste de dupla difusão em ágar utilizando MPA e ceftazidima, mostrou zonas de inibição achatadas e aumentadas (Figura 18-A). As amostras 05, 06, 07, 08, 09, 11 apresentaram um aumento de 12 a 18 mm no halo de inibição quando comparadas com o controle de ceftazidima. Com as amostras 10, 13, 15, 20, 25, 85 e 86, que apresentaram halos de inibição no disco controle de CAZ (8 a 20 mm), foram observados aumentos pequenos no halo de inibição (3 a 5 mm), que poderiam resultar em equívocos na interpretação do teste de sinergismo (Figura 18-B). Os controles IMP e SPM apresentaram aumento no halo de inibição de 24 e 11 mm, respectivamente.

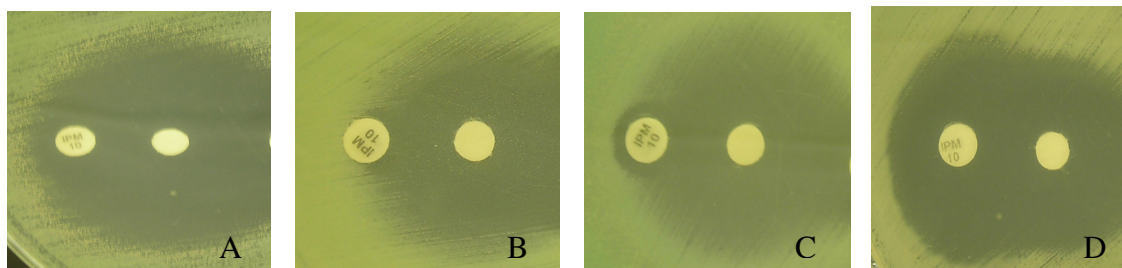


**FIGURA 18** – TESTE DE DUPLA DIFUSÃO EM ÁGAR ENTRE O INIBIDOR ENZIMÁTICO MPA E O SUBSTRATO CAZ PARA DETECÇÃO DE M $\beta$ L EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS.

NOTA: A1 – aumento achatado na zona de inibição (amostra 05); A2 – disco controle (amostra 05). B1 – pequeno aumento na zona de inibição (amostra 13); B2 – disco controle (amostra 13).

O MPA interferiu no crescimento bacteriano formando grandes halos de inibição. Na amostra controle SPM esse halo foi de 40 mm tornando impossível a leitura do teste (Figura 19-A). A zona fantasma presente nas amostras 05, 08 e 09 foi subjetiva, dificultando a interpretação (Figura 19-B). As amostras 06, 10, 11, 14,

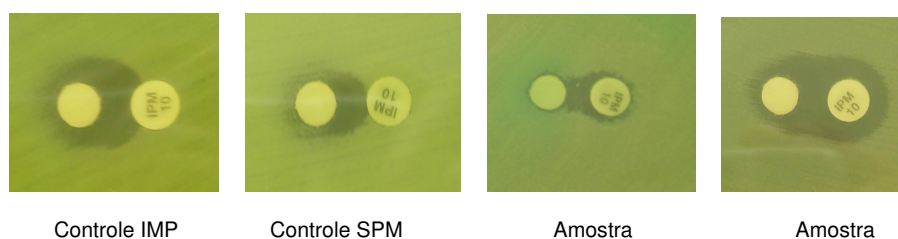
29, 43 e 58 apresentaram um discreto aumento no tamanho do halo de inibição quando comparado com o controle de IMI (3 a 4 mm) (Figura 19-C). Apenas o controle IMP, uma amostra de *A. baumannii*, apresentou um sinergismo evidente para o teste de dupla difusão em disco entre MPA e IMI (Figura 19-D)



**FIGURA 19** – TESTE DA DUPLA DIFUSÃO EM ÁGAR ENTRE O INIBIDOR ENZIMÁTICO MPA E O SUBSTRATO IMI PARA DETECÇÃO DE M $\beta$ L EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS.

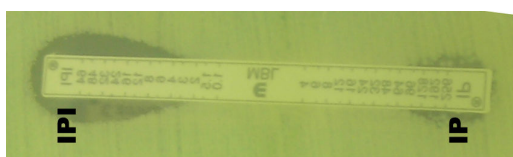
NOTA: A – *P. aeruginosa* controle SPM; B – zona fantasma; C – aumento de halo; D – *A. baumannii* controle IMP

O sinergismo entre os discos de EDTA e IMI apresentou uma grande quantidade de testes positivos, 22 entre as 33 amostras apresentaram zona fantasma (Figura 20) e 2 amostras apresentaram um pequeno aumento no halo de inibição (3 mm).



**FIGURA 20** – TESTE DA DUPLA DIFUSÃO EM ÁGAR IMI/EDTA PARA DETECÇÃO DE M $\beta$ L EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS.

Utilizando a metodologia comercial E-test®, as amostras 05, 06, 07, 08, 9, 11 e 29 foram classificadas como positivas assim como os controles IMP e SPM. A Figura 21 mostra um teste positivo.



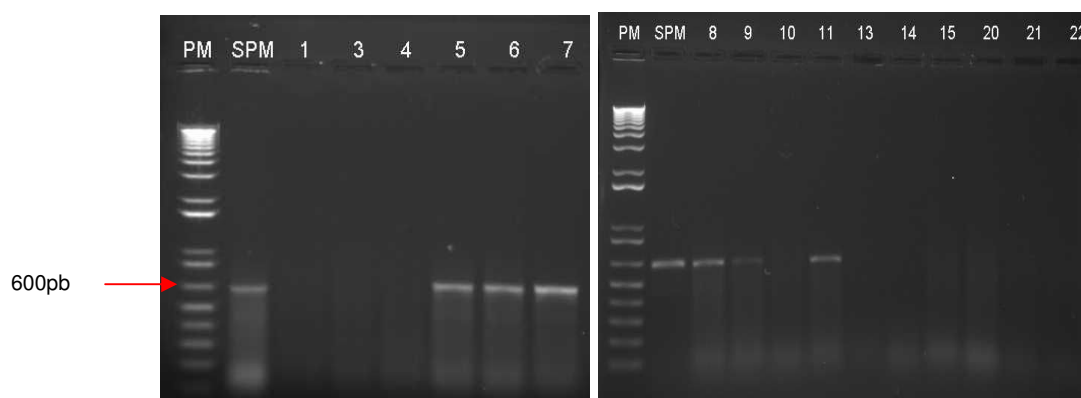
**FIGURA 21** - E-test® PARA DETECÇÃO DE M $\beta$ L EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS.

NOTA: amostra 05

#### 4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A pesquisa dos genes IMP, VIM e SPM, utilizando a metodologia de PCR foi realizada nos 61 isolados de *P. aeruginosa* (resistentes, intermediários e sensíveis aos carbapenêmicos).

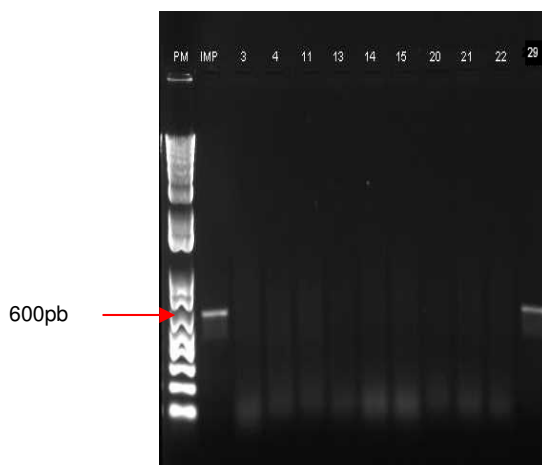
As amostras 5, 6, 7, 8, 9 e 11 apresentaram produtos de PCR de aproximadamente 650 pb, compatíveis com o tamanho do amplicon obtido com a amostra controle de SPM (Figura 22). Apenas a amostra 29 apresentou produto de PCR de 590 pb, compatível com o controle de IMP (Figura 23). Foram observados produtos de PCR para M $\beta$ L somente em amostras resistentes aos carbapenêmicos (CIM >128 $\mu$ g/ml). A figura 24 reúne no mesmo gel alguns produtos de PCR amplificados com os *primers* IMP (590 pb) e SPM (650 pb).



**FIGURA 22** – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1%) DOS ISOLADOS DE *P. aeruginosa* QUE APRESENTARAM PRODUTOS DE PCR AMPLIFICADOS COM OS *PRIMERS* PARA PESQUISA DO GENE *bla*<sub>SPM-1</sub>.

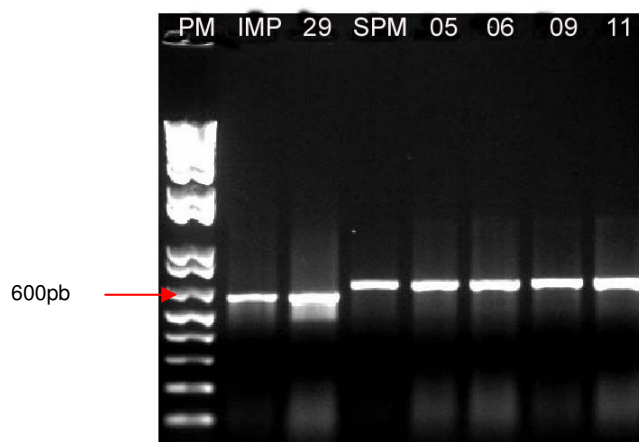
NOTA: PM – marcador de peso molecular de 100pb; SPM – controle positivo *P. aeruginosa* produtora de SPM. Os números correspondem a isolados clínicos de *P. aeruginosa*.





**FIGURA 23** – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1%) MOSTRANDO O ISOLADO DE *P. aeruginosa* QUE APRESENTOU PRODUTO DE PCR UTILIZANDO PRIMERS PARA PESQUISA DO GENE *bla*<sub>IMP-1</sub>.

NOTA: PM – marcador de peso molecular de 100pb; IMP – controle positivo *A. baumannii* produtor de IMP-1. Os números correspondem a isolados clínicos de *P. aeruginosa*.



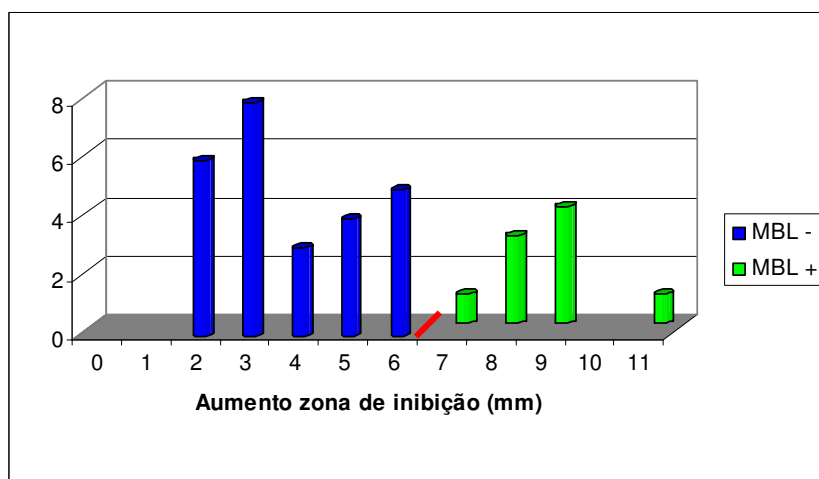
**FIGURA 24** – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1%) DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* E CONTROLES QUE APRESENTARAM PRODUTOS DE PCR COM TAMANHOS COMPATÍVEIS COM O ESPERADO PARA OS GENES *bla*<sub>IMP-Like</sub> (590 pb) E *bla*<sub>SPM-1</sub> (650 pb)

NOTA: PM – marcador de peso molecular de 100pb; IMP – controle positivo *A. baumannii* produtor de IMP-1; SPM – controle positivo de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1. Os números correspondem a isolados clínicos de *P. aeruginosa*.



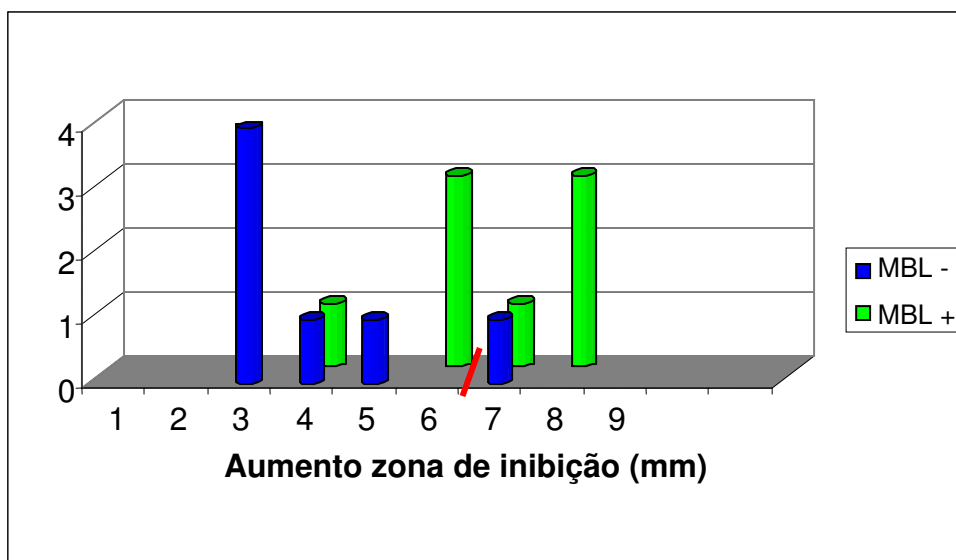
#### 4.4.3 Comparação da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com as Metodologias Fenotípicas para Detecção de M $\beta$ L

Os resultados observados para os 33 isolados de *P. aeruginosa* obtidos por metodologias fenotípicas foram comparados aos resultados da PCR. Os gráficos 4 e 5 apresentam a comparação PCR e metodologia de disco combinado para IMI/EDTA e MER/EDTA, respectivamente. A combinação IMI/EDTA (gráfico 4) detectou as 7 amostras positivas na PCR e não apresentou resultados falsos negativos. A mesma metodologia utilizando a combinação MER/EDTA apresentou 4 resultados falso negativos e 1 falso positivo (gráfico 5)



**GRÁFICO 4** – AUMENTO NO HALO DE INIBIÇÃO PELA ADIÇÃO DE EDTA AO DISCO DE IMIPENEM (DISCO COMBINADO) EM ISOLADOS DE *P. aeruginosa* COM PCR POSITIVA OU NEGATIVA PARA M $\beta$ L.

NOTA: A linha vermelha representa o ponto de corte 7 mm



**GRÁFICO 5** – AUMENTO NO HALO DE INIBIÇÃO PELA ADIÇÃO DE EDTA AO DISCO DE MEROPENEM (DISCO COMBINADO) EM ISOLADOS DE *P. aeruginosa* COM PCR POSITIVA OU NEGATIVA PARA MβL.

NOTA: A linha vermelha representa o ponto de corte (7 mm).

A dupla difusão em ágar utilizando MPA/CAZ detectou as 6 amostras PCR positivas para SPM, mas falhou em detectar a única amostra PCR positiva para IMP (amostra 29). É importante salientar que o controle positivo IMP utilizado para validar o teste fenotípico foi uma amostra de *A. baumannii*.

Dos 24 resultados positivos observados para a metodologia de dupla difusão em ágar utilizando EDTA/imipenem, apenas 7 foram confirmados pela metodologia de PCR. Foram 17 resultados falso positivos (38% especificidade).

A Tabela 8 apresenta a compilação dos resultados observados para a pesquisa de MβL fenotípica e pela PCR, bem como a relação com o perfil genotípico por PFGE

**TABELA 8** – COMPILAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO POR PFGE COM OS RESULTADOS DA PESQUISA DE MβL NOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS

Amostra	Perfil PFGE	PCR	Disco Combinado		Dupla Difusão em Ágar			E-test
			IMI/EDTA	MER/EDTA	MPA/CAZ	MPA/IMI	EDTA/IMI	
1	AI	-	-	-	-	-	+	-
3	AII	-	-	-	-	-	+	-
4	AV	-	-	+	-	-	+	-
5	AIII	SPM	+	-	+	+	+	+
6	AI	SPM	+	+	+	+	+	+
7	AII	SPM	+	+	+	-	+	+
8	AI	SPM	+	+	+	+	+	+
9	AIII	SPM	+	-	+	+	+	+
10	AIV	-	-	-	-*	+	+	-
11	AI	SPM	+	-	+	+	+	+
13	AII	-	-	-	-*		+	-
14	AI	-	-	-	-	+	+	-
15	AII		-	-	-*	-	+	-
20	AIV	-	-	-	-*	-	-	-
21	AI	-	-	-	-	-	-	-
22	AI	-	-	-	-	-	+	-
23	AI	-	-	-	-	-	+	-
24	AI	-	-	-	-	-	+	-
25	AI	-	-	-	-*	-	+	-
29	NR	IMP	+	-	-	+	+	+
30	NR	-	-	-	-	-	-	-
34	NR	-	-	-	-	-	-	-
35	AI	-	-	-	-	-	+	-
37	NR	-	-	-	-	-	-	-
40	NR	-	-	-	-	-	-	-
41	NR	-	-	-	-	-	-	-
43	NR	-	-	-	-	+	+	-
48	NR	-	-	-	-	-	+	-
58	NR	-	-	-	-	+	+	-
61	NR	-	-	-	-	-	-	-
85	NR	-	-	-	-*	-	-	-
86	NR	-	-	-	-*	-	-	-
89	NR	-	-	-	-	-	-	-

NOTA: Perfil PFGE :clonal AI, AII, AIII, AIV; Não relacionado ao clone A: NR;

Resultados testes: (-) negativo; (+) positivo; (-\*)duvidoso

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Considerações Gerais

A despeito dos avanços nas áreas de cuidados médicos e controle de infecção hospitalar, e da introdução de novos agentes antimicrobianos, *P. aeruginosa* mantém-se como uma das principais causas de infecções nosocomiais. A capacidade de adaptação às condições ambientais de nutrição, temperatura e umidade conferem vantagens biológicas a este microrganismo oportunista, garantindo sua sobrevivência em condições adversas. Além disso, a presença de diversos fatores de virulência e a resistência intrínseca a vários antimicrobianos e desinfetantes contribuem para esta realidade.

No presente estudo, a maior parte dos isolados de *P. aeruginosa* foi recuperada de pacientes de UTI, em concordância com os dados de literatura (BRUN-BUISSON *et al.*, 1995; LEVIN *et al.*, 1999; RICHARDS *et al.*, 1999; GARAU, GOMES, 2003; LAUPLANT *et al.*, 2005). É fato que as UTIs constituem ambientes propícios ao desenvolvimento de *P. aeruginosa*, com pacientes graves e imunocomprometidos, pressão seletiva de antimicrobianos e inúmeros procedimentos invasivos que resultam em novas portas de entrada para infecção.

Nas UTIs, estudos relatam que o principal sítio de ocorrência de *P. aeruginosa* é o trato respiratório inferior, geralmente causando pneumonias associadas à ventilação mecânica (VAP) (GALES *et al.*, 2001; GARAU, GOMES, 2003), pois esta situação compromete o *clearance* mucociliar do trato respiratório (BLONDEL-HILL *et al.*, 2007). Em uma meta-análise de 24 estudos totalizando 1689 episódios de VAP, o bacilo gram-negativo predominante foi *P. aeruginosa* (24,4%) seguido por *Acinetobacter spp* (7,9%) (CHASTRE and FAGON, 2002). No entanto, no presente estudo o sítio de maior ocorrência deste microrganismo foi o trato urinário, que para os isolados resistentes foi seguido por amostras representativas de infecção da corrente sanguínea e posteriormente por amostras do trato respiratório. Resultados semelhantes a estes foram observados em um estudo epidemiológico de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos no Canadá, onde 40% das amostras foram recuperadas de infecções do trato urinário (LAUPLANT *et al.*, 2005).

A resistência intrínseca de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos é bem conhecida, mas a aquisição de novos mecanismos de resistência a antimicrobianos anti-pseudomonas, como constatado na rotina laboratorial, é alarmante. A alta mortalidade (48,1%) entre os pacientes com infecções por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos pode ser reflexo da falta de opções de terapias antimicrobianas (ZAVASCKI *et al.*, 2005). Neste estudo, apenas a polimixina B manteve-se ativa contra todos os isolados resistentes aos carbapenêmicos, apresentando um MIC 90 de 0,25µg/ml. Vários estudos descrevem esta droga como única opção terapêutica para alguns isolados multirresistentes (GALES *et al.*, 2003; SADER *et al.*, 2005; ZAVASCKI *et al.*, 2005; MOTTA *et al.*, 2006). Entretanto, o aumento da descrição de amostras resistentes à polimixina B é proporcional ao aumento da sua utilização na rotina, principalmente em UTIs (LANDMAN *et al.*, 2005; MOTTA, 2006).

No presente estudo, as amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos apresentaram 96,7% de sensibilidade para à piperacilina/tazobactam. Níveis semelhantes de sensibilidade a essa droga também foram relatados em outros estudos (LAUPLAND *et al.*, 2005; PARKINS *et al.*, 2006). No Brasil, Kiffer e colaboradores descreveram uma taxa de suscetibilidade a piperacilina/tazobactam de 63,8% (KIFFER *et al.*, 2005). Em outro estudo brasileiro, desta vez multicêntrico, realizado pelo programa de vigilância SENTRY, a sensibilidade de isolados de *P. aeruginosa* multirresistente a este antimicrobiano foi de 71,5% (SADER *et al.*, 2001). É importante salientar que no presente trabalho todos os isolados produtores de MβLs foram sensíveis à piperacilina/tazobactam, com CIM variando entre 8/4 e 32/4µg/ml (ANEXO 1), fato também relatado por Parkins e colaboradores (PARKINS *et al.*, 2006).

As amostras produtoras de MβL do tipo SPM apresentaram resistência intermediária ao aztreonam com CIM de 16 µg/ml (ANEXO 1) e a amostra produtora de MβL do tipo IMP foi considerada resistente apresentando uma CIM de 32 µg/ml (ANEXO 1). Assim como para as outras MβLs, o aztreonam não é um bom substrato para a enzima SPM-1 (TOLEMAN *et al.*, 2002). Segundo Gales e colaboradores, mecanismos adicionais de resistência aos β-lactâmicos explicariam a resistência ao aztreonam nos isolados produtores de MβL (GALES *et al.*, 2003).

A ceftazidima mostrou-se ativa contra 43% das amostras resistentes aos carbapenêmicos. Entre os isolados sensíveis à ceftazidima encontram-se aqueles sensíveis ou com resistência intermediária a ciprofloxacino, amicacina e cefepime,

indicando que a resistência aos carbapenêmicos nestas amostras deve-se possivelmente à perda de porina OprD. Segundo Huang e colaboradores, esta porina pode ser utilizada por meropenem e imipenem, mas não é significativamente utilizada por outros  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos (HUANG and HANCOCK, 1993). Entretanto, como já era esperado, os isolados produtores de M $\beta$ LS apresentaram CIM maiores que 256 $\mu$ g/ml para ceftazidima. A resistência a altas concentrações deste antimicrobiano pode ser explicada por estudos de cinética enzimática, visto que tanto SPM quanto IMP apresentam alta eficiência catalítica para cefalosporinas, com  $k_{cat}/k_m$  0,6 e 0,18 para ceftazidima, respectivamente (WALSH *et al.*, 2005).

Entre os isolados que apresentaram resistência intermediária a pelo menos um dos carbapenêmicos, sete tiveram sensibilidade reduzida ao meropenem, destes, seis apresentaram-se sensíveis ao imipenem, e com diminuição de sensibilidade para outros  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (ANEXO 2). Um possível mecanismo de resistência para estes isolados é a super-expressão do sistema de efluxo MexAB-OprM; os substratos para esta bomba incluem fluoroquinolonas e  $\beta$ -lactâmicos. O meropenem devido à suas cadeias hidrofóbicas também pode ser afetado por este sistema, já o imipenem parece não ser um bom substrato (QUALE *et al.*, 2006).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *P. aeruginosa*

Métodos de tipificação convencionais baseados em sorotipos, biotipos e antibiotipos foram durante muitos anos a primeira linha no delineamento de estudos de epidemiologia bacteriana (STRUELENS *et al.*, 1996). O poder de resolução da tipificação epidemiológica dos microrganismos tem sido expandido pela análise molecular do DNA bacteriano (STRUELENS *et al.*, 1996). Sistemas de tipificação podem ser utilizados em estudos clínicos para determinação dos padrões de colonização e para identificação de fontes de transmissão de microrganismos infecciosos da microbiota endógena ou exógena. Isto contribui para o entendimento da epidemiologia e da patogênese, auxiliando no desenvolvimento de estratégias de prevenção (MERMEL *et al.*, 1991).

O isolamento, em junho de 2003, da primeira amostra de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, alarmou o setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário/UFSC. O aparecimento de novos casos desse fenótipo, até então inexistente naquele hospital, determinou a necessidade de tipificar essas amostras para entender sua epidemiologia. Pretendia-se com isso verificar se os isolados descendiam de um ancestral comum, fazendo parte de uma cadeia direta de replicação e transmissão de hospedeiro para hospedeiro, ou seja, se estes isolados faziam parte de um grupo clonal, como sugeriu Orskov (1983).

Na busca de um sistema simples e com recursos disponíveis no hospital, a primeira tentativa de tipificar esses isolados foi realizar RFLP de uma parte do DNA ribossômico amplificada com os *primers* universais bacterianos para a região 16S. O *amplicon* de aproximadamente 977 pb representa 63% de todo o gene RNAr 16S (1542 pb) (RELMAN, 1993). A utilização de enzimas de restrição para clivar o produto da PCR nas regiões variáveis foi feita por tentativa. Duas enzimas encontraram sítios de restrição no *amplicon*, entretanto não foram capazes de diferenciar padrões dentro da mesma espécie.

Outro sistema utilizado foi o RAPD, uma metodologia de tipificação rápida e possível de ser realizada no hospital por ser baseada em PCR. Este método é muito suscetível a variações técnicas, e pequenas variações nas condições de reação ou nos reagentes podem levar a dificuldade na reprodutibilidade dos resultados. Entretanto, em condições altamente controladas, o RAPD pode apresentar alto nível de discriminação, especialmente quando múltiplos *primers* são utilizados (SINGH *et al.*, 2006). No presente estudo, as reações foram realizadas no mesmo equipamento, utilizando-se os mesmos lotes de reagentes e por uma única pessoa para garantir a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, um controle representado pela cepa referência ATCC *P. aeruginosa* 25823 foi utilizado em todas as reações. Em estudos com isolados de fibrose cística, Maehenthirlingam e colaboradores sugeriram que os *primers* 208 e 272 (10 pb) poderiam ser utilizados com sucesso para tipificação de *P. aeruginosa*. No presente estudo, os isolados foram amplificados com 4 *primers* (208, 272, M13 e 3303) para aumentar o nível de discriminação da metodologia. Diferentes *primers* definem diferentes janelas de variação genética (RENDERS *et al.*, 1996). A avaliação inicial dos géis de eletroforese confirmou a presença de um padrão comum entre os isolados resistentes aos carbapenêmicos (Figura 7, 8, 9 e 10). Com os *primers* 208 e M13, a

clonalidade ficou mais evidente. Entretanto, a interpretação dos resultados é muitas vezes difícil, pois a variação no RAPD não pode ser diretamente relacionada com eventos genéticos específicos. Assim, os critérios definidos por Tenover (1995) não podem ser utilizados e não existem critérios para interpretar a variação no tamanho e na intensidade dos produtos da PCR (SINGH *et al.*, 2006). Mesmo assim, a análise dos géis foi realizada pelo programa Gel-Pro Analyzer 4.0 e os resultados foram avaliados pelo NTSYS. De acordo com o estudo de Speijer (1999), foram consideradas clonais amostras com similaridade superior a 80%, confirmando os resultados da avaliação inicial.

Com os *primers* 272 e 3303, um número bem menor de isolados pode ser relacionado. Este fato pode ser explicado pela grande quantidade de bandas de fraca intensidade observadas com estes *primers*, dificultando a interpretação dos géis. Em especial com *primer* 272 que foi avaliado e recomendado para análise epidemiológica de *P. aeruginosa* em outros estudos (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 1996; CAMPBELL *et al.*, 2000; SILVA FILHO *et al.*, 2001). No presente estudo, utilizou-se gel de poliacrilamida para eletroforese ao invés do gel de agarose utilizado nos estudos supra-referidos, com o objetivo de visualizar um maior número de bandas e com isso aumentar o poder discriminatório da metodologia, pois a poliacrilamida apresenta definição muito maior do que a agarose, podendo separar fragmentos de DNA diferentes em tamanho por poucos pares de base, conforme as condições e concentração do gel. Assim, podemos explicar a diferença entre este e outros estudos em relação aos resultados observados para o *primer* 272. As bandas de fraca intensidade consideradas pelo programa de análise de gel interferiram no resultado final, gerando dúvidas quanto à origem única de alguns isolados.

Para confirmar a hipótese de clonalidade sugerida pelos *primers* 208 e M13, as amostras foram submetidas à análise de macrorestrição por eletroforese de campo pulsado (PFGE). Técnica baseada na digestão do cromossomo com enzimas de restrição, visto que o cromossomo é o componente fundamental de identificação da célula bacteriana, esta metodologia representa a medida preferencial para avaliar a interrelação entre isolados (SINGH *et al.*, 2006).

PFGE é considerado padrão ouro na tipificação molecular. Desta forma, os dados encontrados no presente estudo não deixam dúvidas em relação à disseminação clonal de isolados resistentes aos carbapenêmicos no hospital.



Houve uma boa correlação entre o PFGE e o RAPD com os *primers* 208 e M13. Entre as 27 amostras resistentes avaliadas pelas duas metodologias, 17 foram classificadas como clonais pelo PFGE e apenas um resultado foi discordante para o RAPD. Outras nove amostras que não foram testadas pelo PFGE foram classificadas como pertencentes ao mesmo clone resistente pela metodologia de RAPD totalizando 26 isolados (65%).

Inúmeros estudos relatam surtos de *P. aeruginosa* multirresistentes, principalmente em UTIs, nas mais diversas regiões do planeta (BERT *et al.*, 1998; LUZZARO *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2003; SEKIGUCHI *et al.*, 2007; EMPEL *et al.*, 2007). Surto é definido como o aparecimento agudo de uma quantidade de doenças causadas por um patógeno que ocorre em excesso em relação ao que se espera no tempo e no espaço (STRUELENS *et al.*, 1996). Considerando que as amostras clonais foram isoladas em um período de 2 anos, nas diferentes clínicas do hospital, não foi possível considerar que se esteve diante de um surto e sim da disseminação de uma cepa epidêmica de *P. aeruginosa*.

Analisando cronologicamente as amostras testadas por PFGE, a amostra 05 foi isolada em 03/2004 na CMII, enquanto a amostra 09 foi isolada 16 meses depois (06/2005) na mesma clínica, com perfil de restrição idêntico ao perfil da amostra 05 (PAIII), evidenciando a alta capacidade de permanência de *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar. Da mesma forma, o subtipo PAII foi recuperado na CMIII, 10 meses após o primeiro isolamento (amostra 07). O subtipo PAI foi isolado pela primeira vez em 03/2004 na CCI (amostra 35), 23 dias após o isolamento de PAIII (amostra 05) na CMIII. No mês seguinte o mesmo subtipo foi isolado na UTI (amostra 06); PAI foi recuperado de diferentes pacientes durante todo o ano seguinte até o encerramento das coletas. A disseminação do clone entre as várias unidades pode ter ocorrido por contaminação cruzada entre pacientes, possivelmente carregado através das mãos do pessoal da área médica (auxiliares, enfermeiros e médicos), devido ao contato com superfícies contaminadas ou com pacientes ou equipamentos contaminados. Matar e colaboradores (2005) sugeriram que a colonização cruzada pode ser um importante meio de disseminação e infecção por *P. aeruginosa*, especialmente após a identificação de um clone virulento que foi disseminado por várias unidades em um período de 9 meses. Bergmans e colaboradores (1998) descreveram a importância da colonização cruzada por *P. aeruginosa* em 100 pacientes admitidos na UTI; 50% dos casos de

colonização por este microrganismo aconteceram por colonização cruzada, e os outros 50% foram provavelmente colonizados por fonte endógena.

Na figura 15 seis amostras de um único paciente foram analisadas juntamente com outras amostras clonais, com o objetivo de avaliar o perfil de PFGE de *P. aeruginosa* durante um longo período de hospitalização. O paciente passou por vários períodos de internação hospitalar durante os anos de 2004 e 2005. Sessenta dias antes do isolamento de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos, o paciente havia recebido meropenem por 13 dias, e 30 dias antes recebeu novamente meropenem por mais 7 dias. Na mesma internação, os isolados 01 e 13 foram recuperados de amostras de ponta de cateter e urina, respectivamente, neste período o paciente permaneceu na CMIII, o cateter foi removido e ele não recebeu tratamento para esse microrganismo. Os isolados 14 e 15 (aspirado traqueal e urina, respectivamente), foram recuperados 30 dias após, no período em que o paciente foi transferido para a UTI, e imediatamente após a coleta do material foi iniciada antibioticoterapia com piperacilina/tazobactam por 20 dias. Estes isolados apresentaram-se sensíveis a piperacilina/tazobactam com CIM de 16/4µg/ml (ANEXO 1). Os isolados 3 e 25 foram recuperados de urina e hemocultura, respectivamente, após 60 dias dos primeiros isolamentos quando o paciente voltou para a CMIII, e dez dias após o término da antibioticoterapia. Analisando o padrão de PFGE, observou-se que durante toda a permanência do paciente no hospital, o isolado urinário manteve o mesmo subtipo (PAI); da mesma forma os isolados de cateter, aspirado traqueal e hemocultura apresentaram um segundo subtipo (PAII), que permaneceu com o paciente durante todo o período de hospitalização. O isolamento de *P. aeruginosa* em hemocultura 10 dias após o término do tratamento com a piperacilina/tazobactam pode indicar falha deste antimicrobiano em erradicar o microrganismo que colonizava o paciente, não remoção do foco da infecção, ou reinfecção por uma fonte comum. A presença de um único clone de *P. aeruginosa* multirresistente persistindo por longos períodos (semanas a meses) em diferentes sítios do corpo também foi relatada por Hsueh em pacientes hospitalizados em UTI de queimados (HSUEH *et al.* 1998).

### 5.3 *P. aeruginosa* PRODUTORA DE M $\beta$ L

As M $\beta$ L estão emergindo e limitando as opções terapêuticas para um microrganismo que é conhecido por sua alta resistência natural aos antimicrobianos. A habilidade das M $\beta$ Ls em conferir resistência a  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, inclusive os carbapenêmicos, a ausência de inibidores clínicos disponíveis e o alto potencial de disseminação entre espécies são as principais razões que fazem desta emergência um risco epidemiológico.

O microbiologista deve estar atento à entrada de M $\beta$ L no ambiente hospitalar, alertando a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar para que medidas efetivas bloqueiem a disseminação destes genes. Segundo Urban e colaboradores (2003), seria prudente detectar colonização por produtores de M $\beta$ Ls quando pacientes fossem admitidos em clínicas, em particular nas UTIs e nas unidades oncológicas. É recomendado que o laboratório de Microbiologia informe prontamente o controle de infecção hospitalar, pois o paciente deveria ser considerado como de alto risco, sendo necessárias medidas de isolamento, como precauções de contato (QUEENAN *et al*, 2007). A detecção precoce é recomendada para evitar a disseminação de isolados multirresistentes e com isso ajudar a manter terapias de primeira e segunda linha (URBAN *et al.*, 2003). Infelizmente, a falta de metodologias fenotípicas padronizadas para sua detecção tem sido um obstáculo para a implantação da pesquisa de M $\beta$ L na rotina laboratorial.

No presente estudo avaliou-se as principais técnicas descritas para a detecção fenotípica de M $\beta$ Ls. Em geral, são metodologias simples e de baixo custo, entretanto apresentam algumas variações a serem consideradas como o tipo de enzima pesquisada (IMP, VIM, SPM) e a espécie bacteriana em questão.

A metodologia de disco combinado utilizando imipenem acrescido de EDTA detectou todas as amostras produtoras de M $\beta$ L, sendo considerada a melhor técnica neste estudo. Apesar da pequena quantidade de amostras positivas, a metodologia foi capaz de identificar tanto os isolados produtores de SPM como de IMP. O ponto de corte de 7 mm foi proposto por Yong (2002) em testes com 102 isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* produtores de VIM2, apresentando uma sensibilidade de 95,7% e especificidade de 91,0%. Valores próximos ao ponto de corte foram observados em amostras não produtoras de M $\beta$ L neste estudo, reforçando a importância das boas práticas de laboratório na realização dos testes. Para a

mesma metodologia, a utilização de meropenem acrescido de EDTA não obteve bons resultados.

A utilização de EDTA como inibidor de M $\beta$ L tem sido discutida em razão do seu efeito na permeabilidade da membrana bacteriana, aumentando a sensibilidade a vários antimicrobianos e gerando resultados falso-positivos. Dolara e colaboradores (2005) sugeriram a dupla difusão em ágar como melhor metodologia para detecção dessas enzimas utilizando o quelante EDTA, por apresentar a possibilidade de diferenciar o efeito na permeabilização da membrana do efeito da inibição da M $\beta$ L em decorrência da remoção do zinco. Entretanto, nas condições descritas por Lee e colaboradores (2003), e utilizadas neste estudo, o teste de dupla difusão em ágar utilizando IMI/EDTA, revelou baixa especificidade (38%) devido ao grande número de testes falso-positivos. A diferença na zona de inibição entre amostras produtoras de M $\beta$ L e amostras negativas na PCR foi pouco evidente (conforme mostra a Figura 20) diferindo dos dados apresentados por Lee.

No presente estudo, a dupla difusão em ágar utilizando MPA/ceftazidima detectou as seis amostras SPM, mas apresentou resultado falso-negativo para a amostra IMP positiva pela PCR. Em um dos primeiros trabalhos publicados sobre metodologia fenotípica para detecção de M $\beta$ L, Arakawa e colaboradores (2000) relataram bons resultados com esta metodologia em diversas espécies bacterianas, incluindo *P. aeruginosa* produtora de IMP-1. Da mesma forma, Lee e colaboradores descreveram bons resultados nos testes utilizando 3  $\mu$ l de MPA em sinergismo com ceftazidima. Entretanto no mesmo estudo, outro derivado de tiol, o ácido mercaptoacético (SMA) não detectou amostras de *P. aeruginosa* produtoras de M $\beta$ L. A utilização de SMA acrescido ao EDTA melhorou o desempenho do teste (LEE, 2003). O primeiro estudo de métodos fenotípicos que incluiu isolados de *P. aeruginosa* produtores de SPM avaliou técnicas de dupla difusão em ágar e disco combinado utilizando diversos inibidores de M $\beta$ L, e obteve os melhores resultados de sensibilidade (90,6%) e especificidade (100%) para a metodologia de dupla difusão em ágar utilizando ceftazidima e MPA na distância de 20mm (PICÃO *et al.*, 2006).

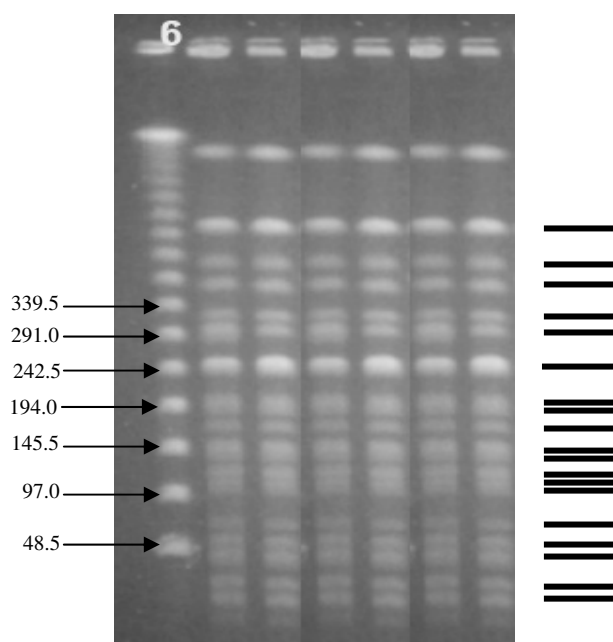
Segundo Franklin e colaboradores a utilização de várias metodologias maximiza a detecção de M $\beta$ L para os diferentes microrganismos a serem testados (FRANKLIN *et al.*, 2006).

A técnica molecular mais utilizada para pesquisa de M $\beta$ L é a PCR. Esta metodologia é empregada para avaliar a hipótese de que o isolado clínico possui genes relacionados a esta enzima, porém não indica que tipo de variante está presente, para isso é necessário seqüenciamento. O presente estudo utilizou as seqüências-consenso publicadas por Sader e colaboradores em 2005 (SADER *et al.*, 2005) para pesquisar os genes de M $\beta$ L nos isolados de *P. aeruginosa*. Foi detectada a presença de SPM e IMP, mas genes relacionados a enzimas do tipo VIM não foram observados. Atualmente a pesquisa destes genes pode ser realizada por uma única reação de PCR; numa reação multiplex é possível detectar todos os tipos de M $\beta$ L caracterizados até o momento (ELLINGTON *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2007).

Entre os 29 isolados resistentes aos carbapenêmicos investigados neste estudo, apenas 7 (24,1%) apresentaram produtos de PCR de tamanho compatíveis com o esperado para os *primers* utilizados para pesquisa de M $\beta$ L. Na maioria dos isolados, a resistência aos carbapenêmicos pode ser atribuída a outros mecanismos, como a super-produção de  $\beta$ -lactamases cromossômicas, diminuição da permeabilidade ou mecanismos de efluxo (BUSCH, 1998; LIVERMORE, 2002). Entre as amostras sensíveis e com sensibilidade intermediária aos carbapenêmicos, nenhum isolado apresentou produto nas amplificações com *primers* para VIM, IMP e SPM.

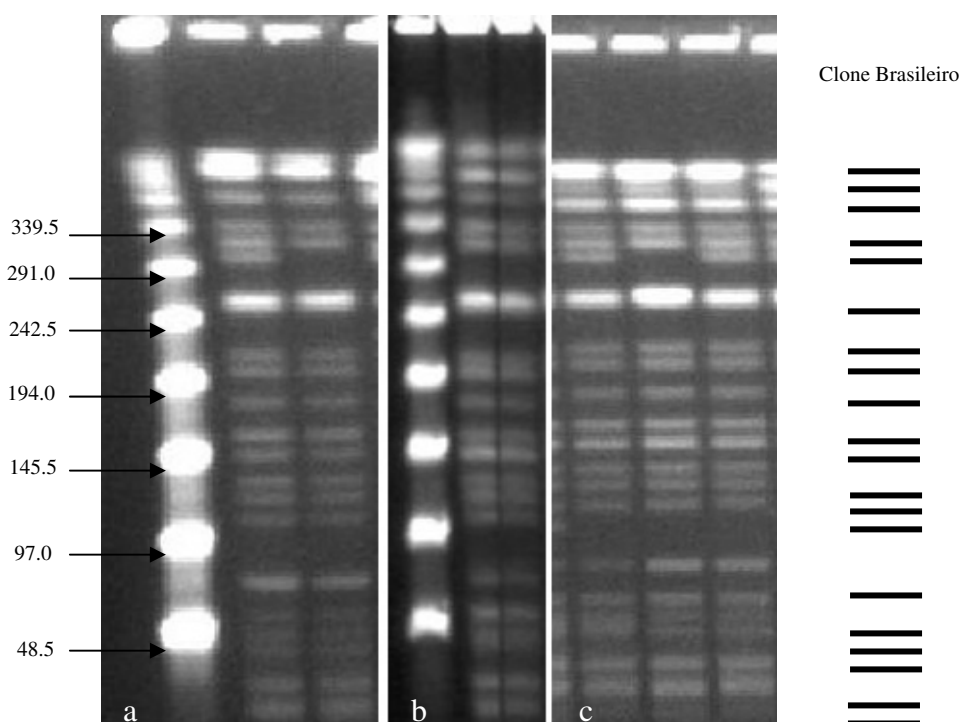
#### 5.4 *P. aeruginosa* CLONE EPIDÊMICO BRASILEIRO

A disseminação no Brasil de um clone de *P. aeruginosa* produtora de metalo- $\beta$ -lactamase SPM descrita inicialmente por Gales e colaboradores em 2003 (GALES *et al.*, 2003), tem sido ampliada por estudos posteriores relatando o mesmo clone em outras regiões do país (POIREL *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2006; PELLEGRINO *et al.*, 2006). A figura 25 mostra o clone SP descrito por Gales em 2003.



**FIGURA 25** - PERFIL DE PFGE DOS ISOLADOS DE *P. aeruginosa* PERTENCENTES AO CLONE SP UTILIZANDO A ENDONUCLEASE *SpeI*

FONTE: GALES (2003).



**FIGURA 26** – COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE PFGE UTILIZANDO *SpeI* DOS ISOLADOS DE *P. aeruginosa* (cluster PA) DESTE ESTUDO (a, c) COM O PERFIL REPRESENTANTE DE *P. aeruginosa* PERTENCENTE AO CLONE BRASILEIRO (b)

FONTE: a/c – o autor  
b - Pellegrino (2006).

Comparando o clone PA descrito neste estudo com o clone disseminado no Brasil (Figura 26), observa-se que são altamente relacionados, embora necessite confirmar com uma corrida eletroforética das amostras nas mesmas condições. Utilizando-se os critérios de Tenover (2005), pode-se afirmar que amostras de *P.aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos isoladas no Hospital Universitário/UFSC em Florianópolis, Santa Catarina pertencem ao clone epidêmico brasileiro. Avaliando apenas as amostras caracterizadas por PFGE, 56,7% dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos no período de dois anos foram provenientes da disseminação deste clone.

Entre os 17 isolados caracterizados como clonais pelo PFGE, apenas seis (35%) carreavam o gene SPM, indicando possível perda de plasmídeo pela maioria das amostras de *P. aeruginosa*. Este fato foi explicado por Bush, considerando o ambiente ecológico. Devido ao fato de que virtualmente todas as MβLs são produzidas em combinação com outras β-lactamases, a produção de múltiplas enzimas significa que uma determinada enzima individual provavelmente será mantida somente se ela ocupa um nicho especializado. A menos que seja necessário para um microrganismo manter a resistência aos carbapenêmicos, o organismo pode continuar a sobreviver com suas β-lactamases “primárias” (BUSCH, 1998). A CIM para os carbapenêmicos foi > 32μg/ml para todos os isolados clonais (ANEXO 1), inclusive para aqueles que não apresentavam MβL, confirmando a existência de outros mecanismos de resistência nestes isolados. A idéia de que a MβL é preservada pelo microrganismo quando este precisa manter a resistência ao carbapenêmico, pode explicar o considerado aumento no isolamento de microrganismos produtores destas enzimas em escala mundial, estando diretamente relacionado à utilização excessiva de alguns de antimicrobianos, em especial os carbapenêmicos. Diferente do que foi observado neste estudo, Pellegrino e colaboradores (2006) relataram que 82% dos isolados de *P. aeruginosa* pertencentes ao clone epidêmico apresentaram gene bla<sub>SPM</sub>.

O isolado IMP *like* positivo não foi relacionado geneticamente a nenhuma das amostras resistentes aos carbapenêmicos.

A disseminação clonal inter-hospitalar para instituições próximas pode ser explicada pela transferência de pacientes infectados e/ou compartilhamento de prestadores de serviço em saúde; entretanto, essa explicação é improvável para hospitais distantes um do outro (GALES *et al.*, 2003). A ocorrência de tipos de PFGE

comuns entre *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 de diferentes hospitais, em distintas localizações geográficas, sugere que esta disseminação ocorra no meio ambiente e/ou indiretamente via comunidade.

O presente estudo representou a primeira descrição de isolados produtores de M $\beta$ L no Estado de Santa Catarina, caracterizando estas amostras como representantes do clone brasileiro. Demonstrou ainda que a principal forma de disseminação dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* multi-resistentes no HU/UFSC foi a transmissão cruzada, evidenciando a necessidade de aprimorar as estratégias de controle de infecção, incluindo políticas para a utilização de antimicrobianos e isolamento dos pacientes com *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos.



## 6 CONCLUSÕES

- A análise da variabilidade genética por duas metodologias moleculares distintas mostrou uma grande diversidade entre os isolados de *P. aeruginosa* sensíveis aos carbapenêmicos e o predomínio de um clone entre os isolados resistentes (*cluster* PA - PFGE, *cluster* RA -208, *cluster* RB – M13).
- A presença de um clone predominante entre os isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos sugere transmissão cruzada como principal mecanismo de disseminação destes isolados no hospital. Entretanto, o encontro de isolados com este perfil de resistência e diversidade genotípica, demonstra que a pressão seletiva pela utilização excessiva de antimicrobianos também ocorre.
- Os resultados de sensibilidade e a alta potência (CIM 50 baixa) sugerem a polimixina B e a piperacilina/tazobactam como drogas de escolha para tratamento de infecções por este agente no hospital estudado.
- O disco combinado utilizando IMI/EDTA para detecção fenotípica de MβLs apresentou os melhores resultados na triagem destas enzimas. Entretanto, o número de isolados produtores de MβLs foi pequeno, e as amostras positivas para SPM pertenciam ao mesmo clone ou subclones. Por isso, sugere-se a utilização de duas metodologias na rotina laboratorial com a finalidade de melhorar a sensibilidade e a especificidade da triagem até a conclusão de novos estudos.
- A presença de MβL foi confirmada pela Reação em Cadeia da Polimerase como o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos nos isolados com CIM > 128µg/ml.
- Apesar da disseminação clonal de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos no HU/UFSC indicar necessidade de melhorias nas medidas de controle de infecção hospitalar, a possível perda do plasmídeo que carrega SPM-1 pela maioria destas amostras clonais

pode indicar diminuição da utilização de carbapenêmicos no período do estudo.

- Esta é a primeira descrição do clone epidêmico brasileiro em Santa Catarina, uma nova região do Brasil distinta geograficamente, o que reforça a hipótese de disseminação ambiental e/ou indireta via comunidade destes isolados.

## REFERÊNCIAS

- ARAKAWA, Y. et al Convenient Test for Screening Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, n.1, p. 40–43, 2000.
- ABOUFAYCAL, H. et al. *bla*<sub>VIM-2</sub> and *bla*<sub>VIM-7</sub> carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in a tertiary care medical center in the United States: report from the MYSTIC program. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 2, p. 614-615, 2007.
- BAHAR, G.A. et al. Detection of VIM-5 metallo- $\beta$ -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. **J Antimicrob Chemother**, v.54, p.282-283, 2004.
- BASSETTI, M. et al. Colistin and rifampicin in the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **J Antimicrob Chemother**. 2008 (epub ahead of print). Disponível em: <[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/ pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)>. Acesso em 13/01/2008
- BELLAIS, S. et al. Efficacy of  $\beta$ -lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agent and Chemother**, v. 46, n.6, p.2032-2034. 2002.
- BENNETTT, P. M. *Integrans* and genes cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.** V 43, 1-4. 1999
- BERGMANS, D.C. et al. Cross colonization with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. **Thorax**, v.53, 1053-1058, 1998.
- BERT, F. et al. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. **J Hosp Infect**, v. 39, p. 53-62, 1998.
- BLONDEL-HILL, E. HENRY, D.A. and SPEERT, D. *Pseudomonas*. In: Murray, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 9<sup>th</sup> ed. Washington, D.C.: ASM Press. 2007. p. 734-748.
- BRITO, D.V.D. et al. An outbreak of conjunctivitis caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian Newborn Intensive Care Unit. **Braz J Infect Dis**, v. 7, n. 4, p. 234-235, 2003.
- BRUN-BUISSON, C. et al. Incidence, risk-factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for severe sepsis. **JAMA**, v. 274, p. 968-974. 1995.
- BUSCH, K. Metallo-  $\beta$ -lactamase: a class apart. **Clin Infect Dis**, v.27, suppl 1, p. 48-53, 1998.

CAMPBELL, M., MAHENTHIRALINGAM, E. and SPEERT, D.P. Evaluation of Random Amplified Polymorphic DNA Typing of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 12, p. 4614-4615, 2000

CARVALHO, A.N.D. et al. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-  $\beta$ -lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial Drug Resistance**. v. 12, n.2, p. 103-108, 2006.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular Characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n 12, p. 4654-4661, 2004.

CASTANHEIRA, M. Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC). **Caracterização de genes que codificam Beta-lactamases mediados por integrons de classe 1 em amostras de *Pseudomonas aeruginosa***. 2005. Disponível em <http://www.lenc.com.br/resulReg.asp?Cod=1889>. Acesso em 20/02/2008.

CHASTRE, J. FAGON, J-Y. Ventilador-associated pneumonia. **Am J Resp Crit Care Med**, v. 165, p. 867-903, 2002.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically (M7-A7)** seventh edition. USA, 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement (M100-S17)**. USA, 2007.

CONEJO, M.C. et al. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 2313-2315, 2003.

CORNAGLIA et al. Relative importances of outer membrane permeability and group 1  $\beta$ -lactamase as determinants of meropenem and imipenem activities against *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v 39, p.350-355, 1995.

CORVEC, S. et al. **Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme**. J Hosp Infect. 2007. (epub ahead of print). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em 13/01/2008.

CRESCO, M.P. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- $\beta$ -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 11, p. 5094-5101, 2004.

DAL PERARO, M. and KLEIN, M. Quantum Simulations with XT3 take a step toward defeating a dangerous strain of antibiotic-resistant bacteria. 2006. Disponível em <http://www.psc.edu/science/2006/enzyme/> Acesso em 23/02/2008.

DOCQUIER, J.D. *et al.* IMP-12, a new plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 1522-1528, 2003.

DOLARA, P. *et al.* EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem-EDTA disk method. **J. Antimicrob. Chemoter.** v. 26, p.340-341, 2005.

EAGYE, K.J. *et al.* A pharmacodynamic analysis of resistance trends in pathogens from patients with infection in intensive care units in the United States between 1993 and 2004. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v.6 n. 11, 2007.

ELLINGTON, MJ. *et al.* Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, p 321-322, 2007.

EMPEL, J. *et al.* Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 9, p. 2829-2834, 2007

EPP, S.F. *et al.* C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 6, p. 1780-1787, 2001.

FAVERO, M.S. CARSON, L.A. BOND, W.W. *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospital. **Science**, v. 173, p. 836-838, 1971

FORBES BA, *et al.* **Bailey e Scott Diagnostic Microbiology**. 10<sup>Th</sup> ed. St louis: Mosby; 1998

FOXMAN B, *et al.* Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives and Innovations*, v. 2, p. 10-18, 2005.

FRANKLIN, C., LIOLIOS, L. and PELEG, A.Y. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 9, p. 3139-3144, 2006.

GALES, A.C. *et al.* Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clin Infect Dis**. v. 32, p 146-155, 2001

GALES, A.C. *et al.* Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-  $\beta$ -lactamase. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, p 699-702, 2003.

GALES, A.C. **Metalo- $\beta$ -lactamases genes prevalentes no Brasil**. 2003. Disponível em: [www.abev.com.br/controlededeinfeccao/palestras/8h30-anacristinagales-genesprevalentes.pdf](http://www.abev.com.br/controlededeinfeccao/palestras/8h30-anacristinagales-genesprevalentes.pdf). Acesso em 20/01/2008.

GARAU, J. GOMEZ, L. *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Curr Opin Infect Dis**, v.16, n.2, p. 135-143, 2003.

GARZA-RAMOS, U. *et al.* Metallo-beta-lactamase IMP-18 is located in a class 1 integron (in96) in a clinical isolate os *Pseudomonas aeruginosa* from México. **Int J Antimicrob Agents**, v. 31, n.1, p. 78-80, 2008.

GIAKKOUP, P. *et al.* Spread of integron-associated VIM-type metallo- $\beta$ -lactamase genes among Imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 2, p.882-825, 2003.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J. *et al.* In vitro interaction of colistina and rifampicina on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **J Chemother**, v. 15, p. 235-238, 2003

GISKE, C.G., RYLANDER, M. and KRONVALL, G. VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 3034-3035, 2003.

GISKE, C.G. *et al.* Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 12, p. 4309-4315, 2006.

HANCOCK, R.E. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other non fermentative gram-negative bacteria. **Clin Infect Dis**, v.27, n. 1, p. 93-99, 1998.

HUANG, H and HANCOCK, R.E. Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol**, v. 175, n.24, p. 7793-7800, 1993.

HORIANOPOULOU, M *et al.* Frequency and predictors of colonization of the respiratory tract by VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* in patients of a newly established intensive care unit. **J Med Microbiol**, v. 55, p. 1435-1439, 2006.

HSUEH, P-H, *et al.* Persistence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in a Intensive Care Burn Unit. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 5, 1347-1351, 1998.

IGLEWSKI BH. *Pseudomonas*. In: Baron S, eds. **Medical Microbiology**. 4 ed. Texas, Library of Congress, 1996.

ISENBERG, H.D. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. 2 ed. ASM press: Washington, D.C., 2004

JONES, R. N., *et al.* Antimicrobial activity of 12 broad-spectrum agents tested against 270 nosocomial blood stream infection isolates caused by non-enteric gram-negative

bacilli: occurrence of 84 resistance, molecular epidemiology, and screening for metallo-enzymes. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 29, p. 187-92, 1997.

KOH, T.H., WANG, G.C. and SNG, L.H. IMP-1 and a novel metallo- $\beta$ -lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p.2334-2336, 2004.

KIFFER, C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n.3 p.216-224, 2003.

LAGATOLLA, C. *et al.* Molecular evolution of metallo- $\beta$ -lactamases-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a nosocomial setting of high-level endemicity. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 7, p. 2348-2353, 2006.

LAUPLAND, K.B. *et al.* Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)-producing strains. **J Infect Diseases**, v.192, p. 1606-1612, 2005.

LANDMAN, D. *et al.* Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, p. 954-957, 2005.

LAURETTI, L. *et al.* Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM-1</sub> a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 7, p. 1584-1590, 1999.

LEE, K. *et al.* Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp* and *Acinetobacter spp*. **J Clin Microbiol**, v.41, n. 10, p. 4623-4629, 2003.

LEE, K. *et al.* Evaluation of Etest MBL for detection of *bla*<sub>IMP-1</sub> and *bla*<sub>VIM-1</sub> allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas spp* and *Acinetobacter spp*. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 2, , p.942-944, 2005.

LEE, K. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>SIM-1</sub>, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n 11, p. 4485-4491, 2005.

LEVIN, A.S. *et al.* Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis**, v. 28, p. 1008-1111, 1999.

LINDEN, P.K. *et al.* Use of parenteral colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis**. v.37, p. 154-160, 2003.

LIVERMORE, D. M. Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamases activity in imipenem-resistant. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, p. 2046-2048, 1992.

LIVERMORE, D. M.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol**, v. 8, p. 557-584, 1995.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clin Infect Dis**, v. 34, p. 634-640, 2002.

LUZZARO, F. *et al.* Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 5, p. 1865-1870, 2001.

MAHENTHIRALINGAM, E. *et al.* Random Amplified Polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with Cystic Fibrosis. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 1129-1135, 1996

MARKOU, N.H. *et al.* Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. *Crit Care*, v. 7, p.78-83, 2003.

MARRA, A.R. *et al.* Blood stream infections with metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 1, p. 388-390, 2006.

MARTINS, A.F. *et al.* Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* of producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo- $\beta$ - in hospital from southern Brazil. **Infection** v. 35, n. 6, p. 457-460, 2007.

MASLOW, J., MULLIGAN, E. ARBEIT, RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin Infect Dis**, v. 17, p. 153-164, 1993.

MASUDA, N. *et al.* Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 2, p. 480-484, 2001.

MENDES, R.E. *et al.* Genetic characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>IMP-16</sub>: a highly divergent *bla*<sub>IMP-1</sub> with a unique genetic context. Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, 4654-4661, 2004.

MENDES, R.E. *et al.* Rapid detection and identification of metallo- $\beta$ -lactamase-encoding by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 2, p.544-547, 2007.



MERMEL, L.A. *et al.* The pathogenesis and epidemiology of catheter-related infection with pulmonary artery Swan-Ganz catheters: a prospective study utilizing molecular subtyping. **Am J Med**, v. 91, 197-205, 1991.

MESAROS, N. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millenium. **Clin Microbiol Infect**, v.13, p. 560-578, 2007.

MOOLENAR, R. L. *et al.* A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmissi. **Control Hosp Epidemiol**, v. 21, p. 80-85, 2000.

MOTTA, F.A. **Avaliação de métodos moleculares de tipagem de isolados nosocomiais de *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistente.** Curitiba, 2006. 96 folhas. Mestrado em Ciências da Saúde – Centro de Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

MOTAOUAKKIL, S. *et al.* Colistin e rifampicin in the treatment of infections from multiresistant *Acinetobacter baumannii*. **J Infect**, v. 53, n. 4 p. 274-278, 2006

MURPHY, T.A. *et al.* Biochemical characterization of the acquired metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 582-587, 2003.

MURTHY, R. Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. **Chest**, v.119, n.2, p. 405-411, 2001.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) REPORT. **Data summary from October 1986/April, Issued May 1996. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. Centers for Disease Control and Prevention.** Atlanta, Georgia, EUA. 1996.

NEURWIRTH, C. *et al.* First occurrence of na IMP metallo-  $\beta$ -lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 12, p. 4486-4488, 2007.

OKAMOTO, K. GOTOH, N. NISHINO, T. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 7, p. 1964-1971, 2001.

ORSKOV, F. ORSKOV I. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the *Enterobacteriaceae*. **J Infect Dis**, v. 148, p. 346-357, 1983.

OSANO, E. *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resstence. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 1, p. 71-78, 1994

PAI, H. *et al.* Carbapenem Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 2, p. 480-484, 2001.

PARKINS, M.D. *et al.* Treatment of infections caused by metallo-  $\beta$ -lactamases-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region. **Clin Microbiol and Infect**, v. 13, n. 2, p. 199-202, 2007.

PELLEGRINO, F.L.P.C. *et al.* Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 7, p. 2420-2424, 2002.

PELLEGRINO, F.L.P.C. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain carrying bla(SPM) metallo-beta-lactamase detected in Rio de Janeiro, Brazil. **J Chemother**, v. 18, n. 2, p. 151-156, 2006.

PERRON, K. *et al.* CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Biol Chem**, v. 279, p. 8761-8768, 2004.

PICÃO, R.C. *et al.* Metallo- $\beta$ -lactamase detection: double-disk synergy (DDST) versus combined disk (CD) tests using ceftazidime (CAZ) and imipenem (IMI) against distinct MBL inhibitors (IMBL). San Francisco, CA: **46<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy** (ICAAC), 2006. Resumo D-444. CD-ROM.

PIER, G., RAMPHAL, R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R. eds. **Principles and practice of infectious diseases**. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livinstone; p. 2587-2615, 2005.

PITOUT, J.D.D. *et al.* Molecular epidemiology of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 2, p. 294-298, 2007.

POIREL, L. *et al.* Molecular analysis of metallo-  $\beta$ -lactamase gene bla<sub>SPM-1</sub>-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n 4, p. 1406-1409, 2004.

PROJAN, S.I. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? **Curr Opin Microbiol**, v. 6, p. 427-430. 2003.

QUALE, J. *et al.* Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n 5, p. 1633-1641, 2006.

QUEENAN, A.N. and BUSH, K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. **Clin Microbiol. Rev**, v. 20, n 3, p. 440-458, 2007.

RASMUSSEN, B. A., and BUSH, K. Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, 223-232. 1997

RENDERS, N. *et al.* Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. **J Clin Microbiol**, v.34, p. 3190-3195, 1996.

RIBEIRO, J. *et al.* Microbiological and epidemiological characterization os imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Brazilian tertiary hospital: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J Chemother**, v. 18, n. 5, p. 461-467, 2006

RICCIO, M.L. *et al.* Characterization of the metallo-  $\beta$ -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*<sub>IMP</sub> allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 5, p. 1229-1235, 2000.

RICHARDS, M.J. *et al.* Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the Unites States. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Pediatric**, v. 103, p. 39- 43, 1999.

RELMAN, D.A. Universal Bacterial 16S rDNA Amplification and Sequencing. In PERSING, D.H. SMITH, T.F., TENOVER, F.C., WHITE, T.J. eds **Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications**. Washington, D.C.; ASM, 1993. p. 489-495.

SADER, H. *et al.* Antimicrobial susceptibilidade os bacteria isolated from the lower respiratory tract of inpatients with pneumonia in Brazilian hospitals – results from the SENTRY surveillance program, 1997 and 1998. **J Pneumol** v. 27, n.2, p. 60-67, 2001

SADER, H. S.; *et al.* Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Bras J Infect Dis**, v. 5, p. 200-214, 2001.

SADER, H.S. *et al.* IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-  $\beta$ -lactamases produced by *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, n. 1, p73-76, 2005

SANTUCCI, S.G. *et al.* Infections in a burn intensive care unit: experience of seven years. **J Hospital Infect**, v.53, p. 6-13, 2003.

SCOULICA, E.V. *et al.* Spread of *bla*<sub>VIM-1</sub> –producing E. coli in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying he *bla*<sub>VIM-1</sub> metallo- $\beta$ -lactamase gene. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 48, p. 167-172, 2004.

SEKIGUCHI, J. *et al.* Molecular epidemiology of outbreaks and containment os drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Tokyo hospital. **J Infect Chemother**, v.13, n.6, 418-422, 2007.

SENDA, K. *et al.* PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla*<sub>IMP</sub>) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 2909-2913, 1996.

SILVA FILHO, L.V.F. *et al.* Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis outpatient clinic. **J Med Microbiol**, v. 50, p. 261-267, 2001

SINGH, A. *et al.* Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

SPEIJER, H. *et al.* Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. **J Clin Microbiol**, v.37, p. 3654-3661, 1999.

STOVER, C.K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 959-964, 2000.

STRUELENS, M.J. *et al.* Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. **Clin Microbiol Infect**, v.2, p.2-11, 1996.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antinfeciosos**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

TENOVER, F.C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

TOLEMAN, M.A. *et al.* Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-  $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, p 673-679, 2002.

TOLEMAN, M.A. *et al.* Genetic characterization of a novel metallo-  $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>IMP-13</sub>, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 583-590, 2003.

TOLEMAN, M.A. *et al.* *bla*<sub>VIM-7</sub>, an evolutionarily distinct metallo- $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. **J Antimicrob Chemother**, v. 48, p 329-332, 2004.

TOLEMAN, M.A. *et al.* Italian metallo- $\beta$ -lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. **J Antimicrob Chemother**, v 55, p. 61-70, 2005.

TRIAS, J. and KIKADO, H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.34, p. 52-57, 1990

TROILLET, N., SAMORE, M.H. CARMELI, Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. **Clin Infect Dis**, v. 25, n. 5, 1094-1098, 1997.

URBAN, C., SEGAL-MAURER, S. and RAHAL, J.J. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis**, v. 36, p. 1268-1274, 2003.

WALSH, T. R. *et al.* Evolution of an integron carrying *bla<sub>VIM-2</sub>* in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, 116-119, 2003.

WALSH, T.R. *et al.* Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.

WANG, h. *et al.* Surveillance for antimicrobial resistance among clinical isolates of gram-negative bacteria from intensive care unit patients in China, 1996 to 2002). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.51, p. 201-208, 2005.

WATANABE, M., IYOBE, S., INOUE, M., MITSUSHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, p. 145-151, 1991.

WIN, Jr. W. *et al.* **Koneman's Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology**. 6<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p. 316-326.

WOODFORD N, *et al.* Carbapenemases of *Cryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*: distribution of *bla<sub>B3</sub>* and characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla<sub>B3</sub>*, in the type strain, NCTN 10016. **Antimicrob Agents Chemother**, v 44, p 1448-1452, 2000.

XAVIER, D.E. *et al.* IMP-18-producing *Pseudomonas aeruginosa* (PSA): increasing diversity of mobile metallo-beta-lactamase (MBL) in Brazil. San Francisco, CA: **46<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**, 2006. Resumo C2-420. CD-ROM

YAN, J.J. *et al.* Metallo- $\beta$ -lactamase in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 2224-2228, 2001.

YAN, J.J. *et al.* Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 49, n. 1, p. 5-11, 2004.

YONG, D. *et al.* Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas spp* and *Acinetobacter spp*. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 10, p. 3798-3801, 2002.

ZAVASCKI, A.P. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, p. 1148-1151, 2005.

## ANEXOS

**ANEXO 1:** Lista das 43 amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos isoladas no laboratório de microbiologia do HU/UFSC, no período de junho de 2003 a junho de 2005.

Número da Amostra	Data Coleta	Idade	Unidade de Internação	Sítio Anatômico
29	27/06/2003	49	UTI	urina
12	23/07/2003	73	UTI	urina
30	04/09/2003	33	CMIII	urina
5	06/03/2004	56	CMII	urina
35	29/03/2004	80	CCI	secreção
57	05/04/2004	37	UTI	urina
6	19/04/2004	75	UTI	cateter
58	05/05/2004	65	CMII	sangue
38	02/09/2004	47	CCI	liq peritoneal
43	22/09/2004	70	UTI	cateter
86	13/10/2004	70	UTI	asp traqueal
7	16/10/2004	84	CMIII	urina
48	12/11/2004	30	CCI	secreção
8	18/11/2004	76	CCI	urina
61	29/11/2004	39	UTI	asp traqueal
17	30/11/2004	34	UTI	asp traqueal
26	01/12/2004	89	CMIII	urina
19	05/12/2004	34	UTI	cateter
28	07/12/2004	51	UTI	cateter
40	02/01/2005	58	CCII	cateter
11	07/01/2005	34	CMI	liq pleural
1	12/01/2005	66	CMIII	cateter
87	15/01/2005	50	CMII	urina
20	31/01/2005	23	CMIII	cateter
15	09/02/2005	66	UTI	urina
89	23/02/2005	37	UTI	asp traqueal
2	24/02/2005	37	UTI	secreção
41	01/03/2005	45	UTI	asp traqueal
10	02/03/2005	23	CMIII	secreção
21	05/03/2005	37	UTI	cateter
25	19/03/2005	66	CMIII	sangue
22	10/04/2005	73	UTI	cateter
23	11/04/2005	48	UTI	asp traqueal
88	12/04/2005	38	CCI	sangue
31	16/04/2005	73	UTI	asp traqueal
24	03/05/2005	21	CMIII	urina
39	03/05/2005	60	Emergência	urina
16	04/05/2005	48	CMI	cateter
85	12/05/2005	21	CMIII	urina
34	19/05/2005	39	Emergência	urina
37	19/05/2005	69	Emergência	urina
4	13/06/2005	67	Emergência	secreção
9	13/06/2005	85	CMII	urina

NOTA: Em vermelho- 14 amostras inviáveis para análise na segunda parte do estudo (Curitiba) em azul – 3 amostras de um único paciente; em verde- 2 amostras de um único paciente.

**ANEXO 2:** Lista das 7 amostras de *P. aeruginosa* com resistência intermediária aos carbapenêmicos isoladas no laboratório de microbiologia do HU/UFSC, no período de fevereiro de 2004 a junho de 2005.

Número da Amostra	Data da Coleta	Idade	Unidade de Internação	Sítio Anatômico
32	06/05/2004	39	Emergência	urina
36	06/12/2004	73	UTI	cateter
44	17/05/2005	19	CMII	cateter
49	01/07/2005	71	Emergência	urina
52	13/03/2005	76	CMI	urina
55	18/03/2005	21	UTI	asp traqueal
71	15/04/2005	66	Emergência	urina

**ANEXO 3:** Lista das 28 amostras de *P. aeruginosa* sensíveis aos carbapenêmicos isoladas no laboratório de microbiologia do HU/UFSC, no período de fevereiro de 2004 a junho de 2005.

Número da Amostra	Data da Coleta	Idade	Unidade de Internação	Sítio Anatômico
50	01/02/2004	66	CMI	urina
62	27/03/2004	67	UTI	asp traqueal
27	30/08/2004	78	CMIII	secreção
51	14/10/2004	57	UTI	asp traqueal
47	03/02/2005	35	UTI	asp traqueal
79	11/02/2005	45	CMIII	secreção
63	23/02/2005	45	UTI	Urina
64	25/02/2005	51	CMIII	Secreção
65	02/03/2005	71	CCI	Cateter
66	09/03/2005	24	CCI	Cateter
69	29/03/2005	51	Emergência	Secreção
68	06/04/2005	12	Pediatria	Urina
70	07/04/2005	63	Emergência	prot vascular
56	11/04/2005	37	UTI	asp traqueal
59	16/04/2005	80	Emergência	urina
74	21/04/2005	64	Emergência	Urina
73	24/04/2005	40	UTI	asp traqueal
76	26/04/2005	35	CCI	Sangue
84	28/04/2005	45	Emergência	Escarro
46	03/05/2005	53	CCII	secreção
80	07/05/2005	69	UTI	asp traqueal
75	10/05/2005	35	CMI	Urina
82	12/05/2005	32	UTI	asp traqueal
42	16/05/2005	81	UTI	asp traqueal
53	18/05/2005	74	Emergência	urina
78	26/05/2005	75	CMIII	Urina
60	01/06/2005	53	UTI	asp traqueal
81	17/06/2005	22	Emergência	Urina

NOTA: Em vermelho – 3 amostras inviáveis para análise na segunda parte do estudo (Curitiba)



**ANEXO – 4** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e perfil de sensibilidade dos 29 isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos frente aos antibióticos anti-pseudomonas

Amostra	MEN		IMP		PTZ		POL		CIP		CAZ		CPM		ATM		GEN		AMI	
1	128	R	32	R	128/4	R	0.25	S	32	R	>256	R	>256	R	>256	R	>128	R	>512	R
4	64	R	32	R	16/4	S	0.5	S	32	R	32	R	32	R	32	R	>128	R	>512	R
5	>128	R	>128	R	16/4	S	0.25	S	32	R	>256	R	>256	R	16	I	>128	R	>512	R
6	>128	R	>128	R	8/4	S	0.5	S	32	R	>256	R	>256	R	16	I	>128	R	>512	R
7	>128	R	>128	R	32/4	S	0.25	S	32	R	>256	R	>256	R	16	I	>128	R	>512	R
8	>128	R	>128	R	8/4	S	0.5	S	32	R	>256	R	128	R	16	I	>128	R	>512	R
9	>128	R	>128	R	8/4	S	0.5	S	32	R	>256	R	256	R	16	I	>128	R	>512	R
10	64	R	32	R	32/4	S	0.25	S	32	R	32	R	16	I	32	R	>128	R	>512	R
11	>128	R	>128	R	8/4	S	0.25	S	32	R	>256	R	>256	R	16	I	64	R	8	S
15	128	R	32	R	16/4	S	< 0.12	S	32	R	8	S	128	R	128	R	>128	R	>512	R
20	64	R	32	R	32/4	S	0.25	S	32	R	32	R	16	I	32	R	>128	R	>512	R
21	128	R	32	R	8/4	S	0.25	S	32	R	8	S	32	R	64	R	>128	R	>512	R
22	128	R	32	R	16/4	S	< 0.12	S	32	R	8	S	64	R	128	R	>128	R	>512	R
23	128	R	32	R	16/4	S	0.25	S	16	R	64	R	16	I	64	R	>128	R	>512	R
24	128	R	32	R	8/4	S	0.25	S	32	R	16	I	32	R	64	R	>128	R	>512	R
25	128	R	32	R	16/4	S	0.25	S	32	R	>256	R	256	R	16	I	>128	R	>512	R
29	>128	R	>128	R	16/4	S	0.25	S	16	R	>256	R	256	R	32	R	>128	R	>512	R
30	128	R	8	I	16/4	S	0.5	S	>32	R	64	R	16	I	32	R	>128	R	32	R
34	64	R	16	R	16/4	S	0.25	S	16	R	8	S	16	I	32	R	>128	R	128	R
35	128	R	32	R	16/4	S	0.5	S	32	R	8	S	32	R	128	R	>128	R	>512	R
37	>128	R	32	R	16/4	S	0.25	S	0.5	S	16	I	16	I	64	R	4	S	8	S
40	16	R	16	R	16/4	S	0.5	S	0.12	S	8	S	8	I	8	I	2	S	4	S
41	16	R	16	R	16/4	S	0.25	S	0.12	S	16	I	8	I	8	I	4	S	8	S
43	64	R	16	R	16/4	S	0.5	S	16	R	8	S	16	I	64	R	>128	R	128	R
48	64	R	32	R	8/4	S	0.25	S	8	R	2	S	16	I	16	I	>128	R	16	S
58	64	R	16	R	8/4	S	0.5	S	16	R	4	S	16	I	64	R	>128	R	64	R
61	64	R	16	R	<1/4	S	0.5	S	0.12	S	1	S	2	S	2	S	1	S	2	S
85	128	R	32	R	8/4	S	0.25	S	32	R	8	S	32	R	64	R	>128	R	>512	R
86	128	R	32	R	<1/4	S	0.25	S	0.06	S	1	S	2	S	4	S	1	S	2	S
CIM 90	128		32		16/4		0.25		32		16		16		32		>128		>512	
CIM 50	64		16		8/4		0.25		0.12		4		8		16		4		8	
% Sensíveis		0		0		96.7		100		10		43		6.6		6.6		10		16.7

NOTA: AMI: Amicacina; ATM: Aztreonam; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacino; GEN: Gentamicina; IMP: Imipenem; MEN: Meropenem; POL: Polimixina; PTZ: Piperacilina/Tazobactam CIM 50: concentração do antibiótico em que 50% dos isolados teve seu crescimento inibido. CIM 90: Concentração do antibiótico em que 90% dos isolados teve seu crescimento inibido

**ANEXO - 5** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e perfil de sensibilidade dos 7 isolados clínicos de *P. aeruginosa* com resistência intermediária aos carbapenêmicos frente aos antibióticos anti-pseudomonas

Amostra	MEN		IMP		PTZ		POL		CIP		CAZ		CPM		AZT		GEN		AMI	
32	8	I	2	S	8/4	S	0.25	S	16	R	64	R	16	I	32	R	>128	R	64	R
36	8	I	2	S	8/4	S	<0.12	S	8	R	8	S	16	I	32	R	64	R	16	S
44	8	I	2	S	16/4	S	0.5	S	8	R	8	S	16	I	32	R	>128	R	64	R
49	8	I	1	S	8/4	S	0.25	S	16	R	4	S	16	I	16	I	>128	R	64	R
52	8	I	4	S	4/4	S	<0.12	S	8	R	2	S	8	S	8	S	>128	R	16	S
55	8	I	8	I	4/4	S	0.5	S	0.25	S	8	S	4	S	8	S	1	S	2	S
71	8	I	1	S	<1/4	S	<0.12	S	0.03	S	0.25	S	2	S	0.1	S	2	S	8	S
CIM 90	8		2		8/4		0.25		8		4		16		16		>128		16	
CIM 50	8		1		<1/4		<0.12		0.03		0.25		2		0.1		1		2	
% Sensíveis	0		83.3		100		100		16.7		83.3		33.3		33.3		16.7		50	

NOTA: AMI: Amicacina; ATM: Aztreonam; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacino; GEN: Gentamicina; IMP: Imipenem; MEN: Meropenem; POL: Polimixina; PTZ: Piperacilina/Tazobactam CIM 50: concentração do antibiótico em que 50% dos isolados teve seu crescimento inibido. CIM 90: Concentração do antibiótico em que 90% dos isolados teve seu crescimento inibido

**ANEXO 6** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e perfil de sensibilidade dos 25 isolados clínicos de *P. aeruginosa* sensíveis aos carbapenêmicos frente aos antibióticos anti-pseudomonas

Amostra	MEN		IMP		PTZ		POL		CIP		CAZ		CPM		AZT		GEN		AMI	
27	1	S	4	S	32/4	S	0.25	S	32	R	>256	R	>256	R	32	R	>128	R	>512	R
42	1	S	2	S	8/4	S	0.5	S	0.25	S	16	I	8	S	32	R	4	S	4	S
46	4	S	2	S	8/4	S	0.5	S	16	R	4	S	16	R	16	I	>128	R	64	R
47	4	S	2	S	16/4	S	0.25	S	16	R	16	I	64	R	64	R	>128	R	128	R
50	4	S	1	S	8/4	S	0.25	S	8	R	4	S	8	S	16	I	>128	R	64	R
53	4	S	1	S	<1/4	S	0.25	S	0.5	S	8	S	8	S	16	I	1	S	4	S
56	2	S	4	S	8/4	S	<0.12	S	0.25	S	8	S	8	S	32	R	4	S	4	S
59	4	S	2	S	8/4	S	0.25	S	0.25	S	8	S	8	S	16	I	1	S	2	S
60	2	S	2	S	32/4	S	1	S	32	R	32	R	16	I	128	R	>128	R	>512	R
63	4	S	2	S	<1/4	S	0.25	S	0.25	S	2	S	4	S	8	S	2	S	2	S
64	1	S	1	S	<1/4	S	0.5	S	0.06	S	1	S	2	S	4	S	1	S	2	S
65	1	S	2	S	<1/4	S	0.25	S	0.12	S	2	S	2	S	8	S	2	S	4	S
66	4	S	4	S	<1/4	S	0.25	S	0.12	S	1	S	2	S	4	S	2	S	4	S
68	0.5	S	2	S	<1/4	S	0.25	S	0.12	S	1	S	2	S	4	S	2	S	4	S
69	2	S	2	S	<1/4	S	0.25	S	0.12	S	1	S	2	S	4	S	2	S	4	S
70	1	S	2	S	<1/4	S	<0.12	S	0.25	S	2	S	4	S	8	S	0.5	S	0.5	S
73	0.5	S	2	S	<1/4	S	0.25	S	0.06	S	1	S	2	S	4	S	2	S	4	S
74	0.5	S	1	S	<1/4	S	0.25	S	0.12	S	1	S	2	S	4	S	4	S	4	S
75	1	S	2	S	<1/4	S	0.25	S	0.12	S	1	S	2	S	2	S	2	S	2	S
76	0.25	S	1	S	<1/4	S	0.25	S	0.12	S	1	S	2	S	4	S	2	S	2	S
78	1	S	4	S	<1/4	S	0.25	S	0.12	S	1	S	2	S	2	S	2	S	2	S
79	0.5	S	1	S	<1/4	S	0.25	S	0.12	S	2	S	2	S	4	S	4	S	8	S
80	2	S	4	S	<1/4	S	0.25	S	0.12	S	0.5	S	2	S	2	S	1	S	2	S
81	0.5	S	2	S	8/4	S	0.25	S	16	R	4	S	16	I	16	I	>128	R	64	R
82	4	S	2	S	16/4	S	<0.12	S	16	R	8	S	32	R	128	R	>128	R	>512	R
CIM 90	1		2		<1/4		0.25		0.25		2		4		4		2		4	
CIM 50	0.5		1		<1/4		<0.12		0.12		1		2		2		1		2	
% Sensíveis		100		100		100		100		73		84.6		76.9		57.7		73		73

NOTA: AMI: Amicacina; ATM: Aztreonam; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; CIP: Ciprofloxacino; GEN: Gentamicina; IMP: Imipenem; MEN: Meropenem; POL: Polimixina; PTZ: Piperacilina/Tazobactam CIM 50: concentração do antibiótico em que 50% dos isolados teve seu crescimento inibido. CIM 90: Concentração do antibiótico em que 90% dos isolados teve seu crescimento inibido

## ANEXO 7

### SOLUÇÕES TAMPÕES

#### 4.1 - TAMPÃO TRIS EDTA

Tris.....	1,21 g
EDTA.....	3,72 g
Água MILLI-Q esterilizada.....	1.000,00 ml

Preparo:

Pesar os sais e dissolver em 900 ml de água MILLI-Q esterilizada em seguida ajustar o pH em 7,5 com NaOH 10 M e completar o volume para 1.000 ml.

#### 4.2 - TAMPÃO SALINA EDTA

NaCl.....	4,38 g
EDTA.....	9,30 g
Água MILLI-Q esterilizada .....	1.000,00 ml

Preparo:

Pesar os sais e dissolver em 900 ml de água MILLI-Q esterilizada em seguida ajustar o pH em 7,5 com NaOH 10 M e completar o volume para 1.000 ml.

#### 4.3 - TRIS BORATO EDTA 10X

Tris.....	108,00 g
EDTA.....	7,50 g
Ácido Bórico.....	55,80 g
Água MILLI-Q esterilizada .....	1.000,00 ml

Preparo:

Pesar os sais e dissolver em 800 ml de água MILLI-Q esterilizada em seguida completar o volume para 1.000 ml. Não ajustar o pH.

#### 4.4 - Tampão de Lise para Gram-negativos

NaOH 10M .....	50,0 ml
SARCOSIL (Sol. Aquosa 30%).....	16,7 ml
EDTA Na2 .....	93,0 g
Água MILLI-Q esterilizada.....	500,0 ml

Preparo:

Pesar o sal e dissolver em 300 ml de água MILLI-Q esterilizada acrescentar o sarcosil mais 45 ml de NaOH 10 M e ajustar o pH em 9.5 utilizando se necessário o restante do NaOH 10 M em seguida completar o volume para 500 ml. Utilizar a solução após 24 horas

#### **4.5 - HIDROXÍDO DE SÓDIO 10M**

NaOH..... 40,0 g  
Água MILLI-Q esterilizada.....100,0 ml

Pesar o sal e dissolver em 100 ml de água MILLI-Q esterilizada. Utilizar a solução após 24 horas